



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101233154 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 09

(21) 申请号 200680028415. 3

*A61K 39/395*(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 06. 06

*G01N 33/53*(2006. 01)

(30) 优先权数据

*C12N 15/13*(2006. 01)

60/687, 971 2005. 06. 07 US

*A61P 37/00*(2006. 01)

60/785, 353 2006. 03. 23 US

*A61P 29/00*(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2008. 02. 01

WO 92/11383 A1, 1992. 07. 09,

(86) PCT国际申请的申请数据

ELENA DiJRTNG et al. IDENTIFICATION

PCT/CH2006/000300 2006. 06. 06

AND CHARACTERIZATION OF A TNF $\alpha$  ANTAGONIST  
DERIVED FROM A MONOCLONAL ANTIBODY.

(87) PCT国际申请的公布数据

《Moleculur Immunology》. 1994, 第 31 卷 (第 14  
期), 1059-1067.

W02006/131013 EN 2006. 12. 14

(73) 专利权人 艾斯巴技术 - 诺华有限责任公司

审查员 陈中伟

地址 瑞士施利伦

(72) 发明人 S·埃韦特 A·巴尔贝里斯

D·M·乌雷奇 A·奥夫德莫尔

P·利希特莱

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

*C07K 16/24*(2006. 01)

权利要求书2页 说明书31页

序列表39页 附图12页

(54) 发明名称

抑制 TNF $\alpha$  的稳定和可溶的抗体

(57) 摘要

本发明特别地涉及对 TNF $\alpha$  特异性的稳定和可溶的 scFv 抗体和 Fab 片段,其包含特异性轻链和重链序列,这些序列针对稳定性、可溶性、体外和体内与 TNF $\alpha$  的结合性以及低免疫原性被优化。所述抗体被设计用于诊断和 / 或治疗与 TNF $\alpha$  相关的紊乱。还公开了表达本发明重组抗体的核酸、载体和宿主细胞,分离它们的方法和所述抗体在药物中的应用。

1. 特异性结合 TNF $\alpha$  的稳定和可溶的抗体或抗体衍生物,所述抗体或抗体衍生物包含是或衍生自序列 SEQ ID NO :1 的轻链可变域 (VL),其与是或衍生自序列 SEQ ID NO :2 的重链可变域 (VH) 组合,其中在衍生自序列 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的情况下,所述抗体或抗体衍生物包含 SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37 或 SEQ ID NO :38,其中所述抗体衍生物是微抗体 minibodies、单链抗体或双特异性抗体片段。

2. 权利要求 1 的抗体或抗体衍生物,其对 TNF $\alpha$  具有特异性。

3. 在前任一项权利要求的抗体衍生物,其是 scFv 抗体,其中 VL 和 VH 域通过接头连接。

4. 根据权利要求 3 的 scFv 抗体,包含 VL- 接头 -VH 序列排列方式。

5. 根据权利要求 4 的 scFv 抗体,其中接头具有序列 SEQ ID NO :10 或衍生自所述序列。

6. 权利要求 5 的 scFv 抗体,其中所述接头的至少一个 G 转变为极性更大或带电荷的氨基酸。

7. 权利要求 6 的 scFv 抗体,其中接头具有序列 SEQ ID NO :39。

8. 根据权利要求 1-2 任一项的抗体衍生物,其是 Fab 片段,其中 VL 域与人 Ig kappa 链恒定区融合,VH 域与人 IgG 的 CH1 域融合,且两个融合多肽通过链间二硫键连接。

9. 根据权利要求 1-2 任一项的抗体或抗体衍生物,其是被标记的或被化学修饰的。

10. 编码根据权利要求 1-8 任一项的抗体或抗体衍生物的 DNA 序列。

11. 含有根据权利要求 10 的 DNA 序列的克隆或表达载体。

12. 用根据权利要求 11 的表达载体转化的适当的宿主细胞。

13. 权利要求 12 的宿主细胞,是原核或真核细胞。

14. 权利要求 12 的宿主细胞,其是大肠杆菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞。

15. 生产根据权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物分子的方法,包括在允许所述抗体或抗体衍生物分子合成的条件下培养权利要求 12、13 或 14 的宿主细胞,和从所述培养物中回收所述抗体或抗体衍生物分子。

16. 包含权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物的药物组合物。

17. 权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物用于生产治疗与 TNF $\alpha$  相关的疾病或作为体外诊断剂检测该疾病的药物的用途。

18. 权利要求 17 的用途,其中所述疾病是骨关节炎、眼色素层炎、炎性肠病、银屑病。

19. 诊断或治疗组合物,包含与药物可接受载体组合的权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物。

20. 诊断或治疗组合物,包含与稀释剂组合的权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物。

21. 诊断或治疗组合物,包含与赋形剂组合的权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物。

22. 组合制剂,包含权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物和至少第二种化合物。

23. 权利要求 22 的组合制剂,其中第二种化合物不是对 TNF $\alpha$  特异性的抗体。

24. 权利要求 22 或 23 的组合制剂在制备用于治疗与 TNF $\alpha$  相关的疾病的药物中的用途。

25. 权利要求 11 的载体在制备用于治疗与 TNF $\alpha$  相关的疾病的药物中的用途,所述药

物用于在人和 / 或动物中基因治疗应用。

26. 权利要求 1-8 任一项中限定的任何 VL 和 VH 序列在制备表达载体中的用途。

27. 稳定的含水药物制剂, 包含未经受在先冻干的治疗有效量的权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物、pH4.8 至 5.5 的醋酸盐缓冲液、表面活性剂和多元醇, 其中该制剂缺乏促进张力 (tonicifying) 量的氯化钠。

28. 权利要求 27 的制剂, 其是等渗的。

29. 权利要求 27 至 28 任一项的制剂, 其中多元醇是非还原糖。

30. 权利要求 29 的制剂, 其中非还原糖是海藻糖。

31. 权利要求 29 的制剂, 其中非还原糖是蔗糖。

32. 权利要求 27 的制剂, 其中抗体衍生物是 scFv。

33. 权利要求 27 的制剂, 其中该抗体结合 TNF  $\alpha$ 。

34. 权利要求 27 的制剂, 其中制剂中抗体的浓度是 0.1 至 50mg/ml。

35. 权利要求 27 的制剂, 其中表面活性剂是聚山梨酯。

36. 权利要求 32 的制剂, 其中 scFv 结合 TNF  $\alpha$ 。

37. 权利要求 27 的制剂, 其中醋酸盐以 5-30mM 的量存在。

38. 权利要求 37 的制剂, 其中醋酸盐以 10-30mM 的量存在。

39. 权利要求 37 的制剂, 进一步包含防腐剂。

40. 权利要求 39 的制剂, 其中防腐剂是苯甲醇。

41. 权利要求 36 的制剂, 其中 scFv 以 30-50mg/ml 的量存在。

42. 一种制造的产品, 包含容纳稳定的含水药物制剂的容器, 该制剂包含未经受在先冻干的治疗有效量的权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物、pH4.8 至 5.5 的醋酸盐缓冲液、表面活性剂和多元醇, 其中该制剂缺乏促进张力量的氯化钠。

43. 权利要求 1-9 任一项的抗体或抗体衍生物用于制备药物的用途, 所述药物用于治疗 TNF  $\alpha$  相关的疾病, 其中所述药物局部或表面地施用。

44. 权利要求 43 的用途, 其中所述疾病是骨关节炎、眼色素层炎、炎性肠病、银屑病。

## 抑制 TNF $\alpha$ 的稳定和可溶的抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及优化的抗体和抗体衍生物,其与肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) 结合并阻断其功能,并具有诊断和/或治疗、预防或改善与 TNF  $\alpha$  相关的疾病的用途;它们的编码序列、生产和在药理学上合适的组合物中的应用。

### 背景技术

[0002] 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ , 亦称恶液质素) 是天然存在的哺乳动物细胞因子,由许多类型细胞对内毒素或其他刺激物应答产生,包括单核细胞和巨噬细胞。TNF  $\alpha$  是炎症、免疫和病理生理反应的主要介质 (Grell, M., 等 (1995) *Cell*, 83 :793-802)。

[0003] 可溶 TNF  $\alpha$  由跨膜蛋白前体切割形成 (Kriegler, 等 (1988) *Cell* 53 :45-53), 分泌的 17kDa 多肽装配成可溶同源三聚体复合物 (Smith, 等 (1987), *J. Biol. Chem.* 262 : 6951-6954; 对于 TNF 的综述, 参见 Butler, 等 (1986), *Nature* 320 :584; Old (1986), *Science* 230 :630)。然后这些复合物与各种细胞上发现的受体结合。这种结合产生一系列促炎作用, 包括 (i) 释放其他促炎细胞因子, 如白介素 (IL)-6、IL-8 和 IL-1, (ii) 释放基质金属蛋白酶和 (iii) 上调内皮粘附分子的表达, 通过吸引白细胞进入血管外组织而进一步放大炎症和免疫级联。

[0004] 许多紊乱与 TNF  $\alpha$  水平升高有关, 其中很多具有显著的医学重要性。已经证明 TNF  $\alpha$  在很多人类疾病中被上调, 包括慢性疾病如类风湿性关节炎 (RA), 炎性肠紊乱包括克罗恩病和溃疡性结肠炎, 脓毒病, 充血性心力衰竭, 支气管哮喘和多发性硬化。人 TNF  $\alpha$  转基因小鼠组成型产生高水平 TNF  $\alpha$  并发展为类似 RA 的自发、有害的多关节炎 (Keffer 等 1991, *EMBO J.*, 10, 4025-4031)。因此 TNF  $\alpha$  被称为促炎细胞因子。

[0005] 现在 TNF  $\alpha$  已被充分确立为 RA 发病机理中的关键因素, RA 是慢性、进行性和使人衰弱的疾病, 其特征是多关节炎和破坏, 伴发热、不适和疲劳的全身症状。RA 还引起慢性滑膜炎, 经常进展为关节软骨和骨破坏。在遭受 RA 的患者的滑膜液和外周血液中都发现 TNF  $\alpha$  水平增加。当将 TNF  $\alpha$  阻断剂给予遭受 RA 的患者时, 它们减轻炎症、改善症状和延迟关节损害 (McKown 等 (1999), *Arthritis Rheum.* 42 :1204-1208)。

[0006] 在生理学上, TNF  $\alpha$  还与保护不受特殊感染的危害相关 (Cerami. 等 (1988), *Immunol. Today* 9 :28)。TNF  $\alpha$  由被革兰氏阴性细菌的脂多糖激活的巨噬细胞释放。这样, TNF  $\alpha$  可能是与细菌脓毒病相关内毒素性休克的发展和发病机理中涉及的中心环节的内源介质 (Michie, 等 (1989), *Br. J. Surg.* 76 :670-671.; Debets. 等 (1989), *Second Vienna Shock Forum*, p. 463-466; Simpson, 等 (1989) *Crit. Care Clin.* 5 :27-47; Waage 等 (1987). *Lancet* 1 :355-357; Hammerle. 等 (1989) *Second Vienna Shock Forum* p. 715-718; Debets. 等 (1989), *Crit. Care Med.* 17 :489-497; Calandra. 等 (1990), *J. Infect. Dis.* 161 : 982-987; Revhaug 等 (1988), *Arch. Surg.* 123 :162-170)。

[0007] 如同其他器官系统一样, TNF  $\alpha$  也被证明在中枢神经系统中起关键作用, 尤其是在神经系统的炎症和自身免疫紊乱中, 包括多发性硬化、Guillain-Barre 综合征 (传染性神

神经元炎)和重症肌无力,和在神经系统的退行性紊乱中,包括阿尔茨海默氏病、帕金森氏症和杭廷顿氏病。 $TNF\alpha$ 还参与视网膜和肌肉相关系统的紊乱,包括视神经炎、黄斑变性、糖尿病视网膜病、皮炎、肌萎缩性侧索硬化和肌营养不良,以及神经系统的损害,包括外伤性脑损伤、急性脊髓损伤和中风。

[0008] 肝炎是另一个与  $TNF\alpha$  相关的炎症性紊乱,除了其他触发物之外,它可以由病毒感染引起,包括EB病毒、巨细胞病毒和A-E型肝炎病毒。肝炎引起门脉和小叶区急性肝炎,随后是纤维化和肿瘤发展。

[0009]  $TNF\alpha$  可以在癌症中介导恶病质,后者引起多数癌症发病和死亡 (Tisdale M. J. (2004), *Langenbecks Arch Surg.* 389 :299-305)。

[0010]  $TNF\alpha$  在炎症、细胞免疫反应和很多疾病的病理过程中所起的关键作用导致人们探寻  $TNF\alpha$  拮抗剂。

[0011]  $TNF\alpha$  是重要的细胞因子,它的全身阻断带来临床上明显感染的频率和严重性增加的风险,尤其是潜伏性结核的重新活化和可能的其他风险,包括诱发淋巴瘤、脱髓鞘疾病和心力衰竭。

[0012] 设计用于治疗  $TNF\alpha$  介导的疾病的一类  $TNF\alpha$  拮抗剂是特异性结合  $TNF\alpha$  并由此阻断其功能的抗体或抗体片段。抗  $TNF\alpha$  抗体的使用表明阻断  $TNF\alpha$  可以逆转归因于  $TNF\alpha$  的作用,包括 IL-1、GM-CSF、IL-6、IL-8、粘附分子和组织破坏减少 (Feldmann 等 (1997), *Adv. Immunol.* -1997 :283-350)。

[0013] 已经提议针对  $TNF\alpha$  的抗体用于预防和治疗内毒素性休克 (Beutler 等 (1985) *Science* :234,470-474)。Bodmer 等于 1993 年 (*Critical Care Medicine*, 21 :441-446, 1993)、Wherry 等于 1993 年 (*Critical Care Medicine*, 21 :436-440) 和 Kirschenbaum 等于 1998 年 (*Critical Care Medicine*, 26 :1625-1626) 论述了抗  $TNF\alpha$  抗体在治疗脓毒性休克中的应用。

[0014] US2003147891 中已经公开了一种通过给予抗  $TNF\alpha$  单克隆抗体或其  $TNF\alpha$  结合片段治疗人类中神经变性疾病的方法。

[0015] W00149321 教导了  $TNF\alpha$  阻断剂,包括抗  $TNF\alpha$  抗体治疗由  $TNF\alpha$  引起的神经疾病和相关紊乱的用途。它提供了一种通过给予  $TNF\alpha$  拮抗剂来治疗所述紊乱的方法。

[0016] W003047510 公开了针对  $TNF\alpha$  的各种类型的单克隆和改造的抗体,它们的生产、包含它们的化合物和在药物中的应用。

[0017] 对治疗  $TNF\alpha$  介导的疾病有用的抗体通常是单克隆抗体 (mAB) 或改造的抗体,前者通过杂交瘤技术从天然来源,通常是小鼠而产生。后者相应于天然存在的抗体,因为它们包含全长重链和轻链,或相应于也可以由天然抗体蛋白水解分裂产生的 Fab 片段,或相应于单链 scFv 抗体,其中重链和轻链可变区的片段通过肽接头连接。

[0018] 抗体的重链和轻链都包含恒定区和可变区。由于非人抗体具有免疫原性,因此在所谓的“杂种”抗体中,抗体中人样序列的量常常增加,该抗体包含人 IgG 恒定区和与动物抗体序列匹配的可变区,该动物抗体在多数情况下是具有期望特异性的鼠抗体。然后这些可变区可以通过诱变进一步被改动变得更类似于典型的人抗体,产生“人源化”抗体。在又一个可供选择的方法中,仅仅抗原结合部分,即小鼠抗体可变区的互补决定区 (CDRs) 与人抗体的构架区结合,产生“CDR 移植”抗体。

[0019] 现有技术中已经描述了针对 TNF $\alpha$  的单克隆抗体。Meager 等 1087 (Hybridoma 6 : 305-311) 描述了针对重组 TNF $\alpha$  的鼠单克隆抗体。Shimamoto 等于 1988 年 (Immunology Letters 17 :311-318) 描述了针对 TNF $\alpha$  的鼠单克隆抗体在预防小鼠内毒素性休克中的应用。

[0020] US5919452 公开了抗 TNF $\alpha$  嵌合抗体以及它们在治疗与 TNF $\alpha$  存在相关的病理改变中的应用。

[0021] Feldman 等于 (1998) 年 (Transplantation Proceedings30 :4126-4127)、Adorini 等于 1997 年 (Trends in Immunology Today18 :209-211) 和 Feldmann 等于 1997 年 (Advanced Immunology64 :283-350) 论述了抗 TNF $\alpha$  抗体在治疗 RA 和克罗恩病中的应用。这种疗法中使用的 TNF $\alpha$  的抗体一般是嵌合抗体,如 US5919452 中描述的抗体。

[0022] US20003187231 公开了具有结合提高的特征的含至少一个非人 CDR 区的人源化抗 TNF $\alpha$  抗体。此外,在国际专利申请 WO 92/11383 中公开了对 TNF $\alpha$  特异性的重组抗体,包括 CDR 移植抗体。Rankin 等于 (1995), (British J. Rheumatology 34 :334-342) 描述了这种 CDR 移植抗体在 RA 治疗中的应用。

[0023] W09211383 公开了一种对 TNF $\alpha$  特异性的重组的人源化 CDR 移植抗体,其来源于鼠单克隆抗体 61E7、hTNFI、hTNF3 或 101.4,并且它教导了所述抗体的生产和在诊断和 / 或治疗与 TNF $\alpha$  相关的紊乱中的应用。

[0024] 在仅仅最近才成为市场上可买到的 TNF $\alpha$  的特异性抑制剂当中,已经证明针对 TNF $\alpha$  的单克隆、嵌合小鼠 - 人抗体 (英夫利昔单抗, Remicade<sup>TM</sup>; Centocor Corporation / Johnson & Johnson) 在治疗 RA 中的临床功效 (Elliott et. al. 1994, Lancet 344 : 1105-1110 ;Mani 等 (1998), Arthritis & Rheumatism 41 :1552-1563). 也已经证明英夫利昔单抗在治疗炎性肠紊乱克罗恩病中的临床功效 (Baert 等, 1999, Gastroenterology 116 :22-28.)。

[0025] US22002037934 公开了通过给予抗 TNF $\alpha$  抗体如英夫利昔单抗治疗肝炎。

[0026] US6428787 教导了用抗 TNF $\alpha$  抗体治疗神经疾病和与 TNF $\alpha$  相关的疾病,包括英夫利昔单抗、CDP571 和 D2E7。

[0027] 业已开发了一种人抗 TNF $\alpha$  单克隆抗体 (Abbott)D2E7 (Adalimumab) 治疗 RA 和克罗恩病 (W09729131)。Celltech 正在开发一种人源化单克隆抗 TNF $\alpha$  IgG4 抗体 CDP571 (EP0626389) 来治疗克罗恩病,和一种人源化单克隆抗 TNF $\alpha$  抗体片段 CDP870 来治疗 RA。US2003185826 中公开了局部给予治疗局部紊乱的所述抗体。

[0028] 产生了针对众多不同抗原的很多单链抗体 (scFvs), 特别是因为使用技术,例如噬菌体展示或核糖体显示可以容易地选择高结合能力的抗体。而且,可以在微生物系统中生产 scFv 抗体,这与生产治疗性全长抗体相比费用较低有关。

[0029] 除常规细胞外和体外应用之外,scFvs 也已经成功用于细胞内 (Worn 等 2000, JBC, 28 ;275 (4) :2795-2803 ;Auf der Maur 等 2002, JBC, 22 ;277 (47) :45075-45085 ;Stocks MR, 2004, Drug Discov Today. 15 ;9 (22) :960-966) ;因此,已经开发了针对细胞内抗原的 scFvs。通常,功能性 scFvs 的细胞内表达受到它们的不稳定性、不溶性和形成聚集体倾向的限制。因为这个原因,使用所谓的“质量控制”筛选已经成功开发了体内筛选 scFv 抗体的系统,其在细胞内环境 (例如核、细胞质) 典型的还原条件下特别可溶和稳定 (W00148017 ;

Auf der Maur 等 (2001), FEBS Lett. 508 :407-412 ;Auf der Maur 等 (2004), Methods 34 :215-224), 并且已经致使鉴定到了为了这种目的的特别稳定和可溶的 scFv 构架序列 (W003097697)。此外, 这些构架在天然氧化条件下细胞外环境中亦显示出异常的表达水平以及稳定性和可溶性性能增加。因此, 这些有利的生物物理和生化特性转化为有利的高产量和使这些抗体片段一旦对准特异性抗原就能够作为蛋白治疗剂在特定治疗区域进行局部和 / 或全身应用。由于 scFv 抗体和 Fab 片段与全长抗体相比缺少被单核细胞例如天然杀伤细胞的 Fc 受体识别的 Fc 部分, 因此它们不引起依赖于抗体的细胞介导细胞毒性 (ADCC) 并因此不会引起由于与非靶细胞上 Fc 受体结合造成的无特异性的毒性。

[0030] 因此, 需要用于治疗与 TNF  $\alpha$  相关的紊乱如 RA 的新的有效形式的抗体, 尤其是通过局部给药可以提供持续、可控制疗法且副作用程度低的治疗。本发明提供了有效和连续治疗关节炎及其他 TNF  $\alpha$  介导的紊乱的炎性过程或病理生理机制, 尤其是各种形式疼痛的抗体、组合物和方法。

[0031] 本文引用的全部出版物和参考文献以它们的整体在此引入作为参考。

[0032] 发明公开内容

[0033] 因此, 本发明的一般目的是提供在体外和体内特异性结合 TNF  $\alpha$  的稳定和可溶的抗体或抗体衍生物。在优选实施方案中, 所述抗体衍生物是 scFv 抗体或 Fab 片段。

[0034] 现在, 为了实施本发明的这些目的和随着描述的进行会变得更显然的其它目的, 所述抗体或抗体衍生物表现出以下特征: 它包含是或衍生自序列 SEQ ID NO :1 的轻链可变域, 其与是或衍生自序列 SEQ ID NO :2 的重链可变域组合, 其中在衍生序列的情况下, 所述序列在所述 VL 域的构架区内具有最多达到 5 个改变和 / 或在所述 VH 域的构架区内具有最多达到 9 个改变。

[0035] 本发明的一个优选实施方案是所述抗体或抗体衍生物, 其中在构架区中任何位置导入一个或多个氨基酸改变, 优选在选自下组的一个或多个位置: VL 域的 4、46、65、67、70 和 83 位, 和 / 或在选自下组的一个或多个位置: VH 域的 11、16、28、43、48、68、70、71、72、73、76、77、79、93 和 112 位。更优选, 至少一个转变产生在 SEQ ID NO :3 (对于 VL) 和 / 或 SEQ ID NO :4 (对于 VH) 中存在的氨基酸, 和甚至更优选总共存在最多 13 个转变。

[0036] 最优选, 所述抗体或抗体衍生物包含序列 SEQ ID NO :1 的 VL 域和 / 或序列 SEQ ID NO :2 的 VH 域或衍生自该序列 SEQ ID NO :2 的 VH 域, 或序列 SEQ ID NO :11 的 VL 域和序列 SEQ ID NO :4 的 VH 域。如果本发明抗体的 VH 域包含 SEQ ID NO :1 的 VL 域, 在优选实施方案中, VH 序列衍生自 SEQ ID NO :2 使得在 68 位苯丙氨酸转变为丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸。VH 内外加的改变是任选的。这个类型的 scFv 抗体在 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36 和 SEQ ID NO :37 中给出。

[0037] 在本发明的另一个优选实施方案中, 所述抗体或抗体衍生物衍生自具有 VL 序列 SEQ ID NO :1 和 VH 序列 SEQ ID NO :2 的抗体, 并且包含至少一个在至少一个 CDRs 中转变为 VL 序列 SEQ ID NO :5 和 / 或 VH 序列 SEQ ID NO :6 或 SEQ ID NO :25 的相应 CDR 中存在的残基的氨基酸残基。

[0038] 在本发明的非常优选的实施方案中, 在所述抗体或抗体衍生物中, VL CDR2、VL CDR3、VH CDR2 或 VH CDR3 中至少一个 CDR 转变为 VL 序列 SEQ ID NO :5 和 / 或 VH 序列 SEQ ID NO :25 或 SEQ ID NO :6 的相应 CDR。

[0039] 最优选,所述抗体或抗体衍生物包含下列 VL/VH 序列组合:

[0040] VL SEQ ID NO:7/VH SEQ ID NO:2、

[0041] VL SEQ ID NO:8/VH SEQ ID NO:2、

[0042] VL SEQ ID NO:1/VH SEQ ID NO:9、

[0043] VL SEQ ID NO:1/VH SEQ ID NO:25、

[0044] VL SEQ ID NO:1/VH SEQ ID NO:28、

[0045] VL SEQ ID NO:1/VH SEQ ID NO:29、

[0046] VL SEQ ID NO:26/VH SEQ ID NO:30、

[0047] VL SEQ ID NO:27/VH SEQ ID NO:30。

[0048] 在另一个优选实施方案中,本发明的抗体或抗体衍生物对人 TNF $\alpha$  具有特异性。优选,抗原结合的特征是  $K_d$  为  $\approx 100\text{nM}$  或更低。更优选,抗体的  $K_d$  为  $10\text{nM}$  或更低,最优选  $1\text{nM}$  或更低。

[0049] 根据本发明的抗体衍生物是例如 Fc 融合体、毒素融合体、与酶活性的融合体、不同形式如微抗体 (minibodies)、双功能抗体 (diabodies)、线性抗体、单链抗体、双特异性抗体片段,特别是 scFv 和 Fab 片段。

[0050] 本发明的另一个优选目的是 scFv 抗体,其 VL 和 VH 域通过接头连接,优选以 VL-接头-VH 序列方式排列。更优选所述接头具有序列 SEQ ID NO:10。

[0051] 本发明的另一个优选目的是衍生自 SEQ ID NO:40 (TB-A) 的 scFv 抗体。这种抗体可以通过诱变获得,和在构架区、CDR 和 / 或接头序列中包含三个或更少突变。优选,scFv 抗体具有序列 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37 或 SEQ ID NO:38。

[0052] 本发明的另一个优选目的是 Fab 片段,其包含与人 Ig $\kappa$  链恒定区融合的 VL 域,和与人 IgG 的 CH1 域融合的 VH 域,两个融合多肽通过链间二硫键连接。

[0053] 在又一个方面,本发明的抗体或抗体衍生物,例如抗体片段被标记或化学修饰。

[0054] 本发明还提供了编码本发明任何抗体或抗体衍生物的 DNA 序列,以及含所述 DNA 序列的克隆或表达载体。此外,提供了用所述 DNA 序列转化的适当的宿主细胞,优选是大肠杆菌、酵母或哺乳动物细胞。

[0055] 此外,提供了生产本发明抗体或抗体衍生物的方法,包括在允许抗体或抗体衍生物合成的条件下培养用编码任何所述抗体或抗体衍生物的 DNA 转化的宿主细胞,和从所述培养物中回收所述分子。优选,所述方法提供了从大肠杆菌纯化的 scFv 抗体或 Fab 片段。

[0056] 本发明的另一个方面是本发明提供的抗体或抗体衍生物作为体外诊断的诊断工具和 / 或作为药物的用途。特别优选这个用途是在本文任何与 TNF $\alpha$  相关的状况中。

[0057] 本发明还包括一种组合物,其包含本发明抗体或抗体衍生物与药物可接受载体、稀释剂或赋形剂组合,所述组合物待用作治疗与 TNF $\alpha$  相关的疾病的药物。

[0058] 在本发明的更多方面提供了组合制剂,其包含本发明的抗体或抗体衍生物,优选与不是对 TNF $\alpha$  特异性的抗体或抗体衍生物的第二个化合物组合。

[0059] 在本发明的又一个方面,包含编码本发明 scFv 抗体的 DNA 序列的载体用于基因治疗。

[0060] 与 TNF  $\alpha$  相关的疾病的治疗通过由于 TNF  $\alpha$  与抗体或抗体衍生物之间的强烈相互作用导致阻断 TNF  $\alpha$  来实现。优选,考虑自身免疫、急性或慢性炎症状况、癌症相关疾病、疼痛、神经病学和神经变性紊乱、传染病和心血管疾病的治疗。

[0061] 附图简述

[0062] 当考虑了下列详细说明后,将更好地理解本发明并且除上面列出的目的之外的目的将变得很显然。这种说明参考附图,其中:

[0063] 图 1 显示了具有 TB-A 和 TB-B 序列的 scFv 抗体的方案,划定了最频繁变异的范围。星号指示本发明抗体构架区中这一位置容许氨基酸改变。CDRs (灰色背景强调 CDRs) 下面指出的氨基酸可以用在各自的 CDRs 中。

[0064] 图 2 显示了 Fab 片段表达的示例性方案。

[0065] 图 3 显示了当在大肠杆菌中表达时 scFvs 的产量。A. 表达蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。B. TB-A 和 TB-wt 的分析型凝胶过滤,显示了 TB-A 优异的可溶性。

[0066] 图 4 显示了 ELISA 测定的不同 scFv 抗体对 TNF  $\alpha$  亲和力的比较。

[0067] 图 5 显示了在小鼠 L929 成纤维细胞中,人 TNF  $\alpha$  诱导的细胞毒性的抑制。A. TB-A 与 TB-wt 和英夫利昔单抗 (infliximab) 相比的浓度依赖性抑制,显示了 IC<sub>50</sub> 值。B. TB-A 衍生物阻断 TNF  $\alpha$  诱导的细胞毒性的比较。C. TB-A 的 scFv 和 Fab 形式的比较。

[0068] 图 6 显示了抗体治疗对人 TNF  $\alpha$  诱导的大鼠关节肿胀的作用 (实验 :5. 3.、实验 1)。

[0069] 图 7 显示了组织病理炎症得分的评分方案。

[0070] 图 8 显示了抗体治疗对人 TNF  $\alpha$  诱导的大鼠关节炎的作用 (实验 :5. 3.、实验 1)。

[0071] 图 9 显示了抗体治疗对人 TNF  $\alpha$  诱导的大鼠关节肿胀的作用 (实验 :5. 3.、实验 2)。

[0072] 图 10 显示了抗体治疗对人 TNF  $\alpha$  诱导的大鼠关节炎的作用 (实验 :5. 3.、实验 2)。

[0073] 图 11 显示了 TB-A 在不同体液中的稳定性。

[0074] 本发明的实施方式

[0075] 已经发现包含所谓的“质量控制 (quality control)”筛选 (W00148017) 中鉴定的构架区的抗体或抗体衍生物的特征是普遍高稳定性和 / 或可溶性,并因此在细胞外应用范围如中和 TNF  $\alpha$  中可能也有用。本发明提供了以稳定性和可溶性增加为特征的、特异性识别和结合 TNF  $\alpha$  并由此适于体内阻断 TNF  $\alpha$  功能的抗体或抗体衍生物。所述抗体或抗体衍生物的特征为 EP1479694 中公开的由针对具有不依赖于其 抗原结合部位的特别稳定和可溶构架区的抗体进行筛选的“质量控制”筛选得到的特殊构架区。如果筛选中使用的构架区是人抗体构架区,它们可以被认为是应用于人的非免疫原性构架区。本发明抗体的 CDRs 与以高亲和力 (Kd = 0. 4nM) 特异性结合人 TNF  $\alpha$  并可以阻断 TNF  $\alpha$  与它的受体结合的鼠单克隆抗体 Di62 的 CDRs (D  $\bar{o}$  ring 等,1994) 相同或衍生自它们。此外,在小鼠 L929 细胞中,Di62 抑制人 TNF  $\alpha$  诱导的细胞毒性。将来自该小鼠抗体的 CDRs 移植到显然最合适的、抗原结合性能不明确的人受体构架区 (其中所述构架区具有 VL 序列 SEQ ID NO :5 和 VH 序列 SEQ ID NO :6,所述序列通过 (GGGGS)<sub>4</sub> 接头 (SEQ ID NO :10) 连接) 上的显然步骤产生

了下述序列的 scFv 抗体：

[0076] DIVLTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVWVYQQRPGKAPKRLIYSAFNRYTG

[0077] VPSRFSGSGSGTEFTITITISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGKLEVKRGGGGSG

[0078] GGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYSFTHYGMNWVRQAPGQ

[0079] GLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTLTRDTSIGTVYMELTSLTSDDTAVYYCARER

[0080] GDAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO :3+SEQ ID NO :10+SEQ ID NO :4)

[0081] 所述 scFv 抗体被成作 TB-B。TB-B 在蛋白表达中得到好的产量 (图 3a), 但是不能特异性结合 TNF  $\alpha$  (图 4a)。

[0082] 因此, 为获得下述特性的抗体或抗体衍生物: (i) 对结合 TNF  $\alpha$  具有足够的特异性, (ii) 是足够可溶的, 以允许有效生产和纯化并体内阻断 TNF  $\alpha$ , (iii) 足够稳定以致可有效作为药物, 不会经受快速降解和 (iv) 足够的非免疫原性, 通过改变构架区和 CDRs 寻求最好的可溶性和最好的抗原结合特性之间的折衷。本发明提供了为标准 (i-iv) 的组合而优化的 VL 和 VH 的序列。包含通过 (GGGS)<sub>4</sub> 接头与所述 VH (SEQ ID NO :2) 连接所述 VL (SEQ ID NO :1) 的 scFv 抗体被称为 TB-A。SEQ ID NO :40 给出了 TB-A 的序列。这个抗体仍然相当稳定和可溶以致当由大肠杆菌表达和纯化时获得满意的产量 (图 3A), 并且它不聚集 (图 3B)。它对 TNF  $\alpha$  的结合特性是优异的, 具有 0.8nM 的 Kd。

[0083] 本发明还公开了以多种方式衍生自 TB-A 中存在的序列的 VL 和 VH 序列。首先, 已经发现在 VL 构架区的不超过五个位置和 / 或在 VH 构架区的不超过九个位置的点突变是可接受的, 尤其是致使构架区更像 TB-B 的点突变, 即对于 VL 更像 SEQ ID NO :3 或对于 VH 更像 SEQ ID NO :4。包含通过 (GGGS)<sub>4</sub> 接头连接的序列 SEQ ID NO :11 的 VL 域和序列 SEQ ID NO :4 的 VH 域的 scFv 抗体被称为 TB-B R46L, 因为它与 TB-B 仅在 VL 第 46 位不同。与 TB-B 相比, 这个抗体仍然对 TNF  $\alpha$  具有好的结合性能 (Kd  $\approx$  100nM)。这提示 TB-B R46L 相对于 TB-A 改变的数量代表了可变域构架区改变的近似上限。

[0084] 在本发明的优选实施方案中, 仅单个或两个点突变引入 TB-A 的 VL 和 / 或 VH 构架区。优选的突变的构架区残基对于 VL 是在第 4、46、65、67、70 和 83 位, 和对于 VH 是在第 11、16、28、43、48、68、70、71、72、73、76、77、79、93 和 112 位。所述位置根据序列表中的编号来编号。氨基酸置换优选“保守的”, 或使得替换的氨基酸与 TB-B 序列中存在的相应氨基酸更相似或优选甚至与其相同。例如, TB-A 中 VH 的 A76 可以转变为 I76, 如同 TB-B 中存在的那样, 但是它也可以转变为具有相似的即非极性侧链的另一个氨基酸, 如 V 或 L。这是“保守性”氨基酸置换的一个实例。现有技术中已经定义了适于本文使用的“保守性”置换的具有相似侧链的氨基酸残基家族, 包括碱性侧链 (K、R、H)、酸性侧链 (D、E)、不带电荷的极性侧链 (Q、N、S、T、Y、C)、非极性侧链 (G、A、V、L、I、P、F、M、W)、 $\beta$  分支侧链 (T、V、I) 和芳香侧链 (Y、F、W、H)。一个优选保守性改变是 VL 在 83 位的改变, 因为 V 转变为 F (SEQ ID NO :26) 或 A (SEQ ID NO :27)。然而, 在 SEQ ID NO :32 中, VL 中的非保守性改变是 V83E, 其与 CDR1 的改变即 N31D 组合, 和在 VH 具有 V79A 改变。另一个特别的 TB-A 变体是 SEQ ID NO :33, 它在 VH 中具有保守性 F68L 交换, 其与 VL 通过接头连接, 接头第 2 位携带 R, 替换了 G。

[0085] 非常优选的单个氨基酸交换是 VL 中 R65S 或 Y67S, 和 VH 中 K43Q 或 F68 交换为 V、L 或 A。非常优选的双交换是 VH 中 F70L/L72R 或 A76I/S77G。包含具有所述改变的 TB-A 序

列的 ScFv 抗体显示抑制 L929 细胞中由 TNF  $\alpha$  诱导的细胞毒性。它们中的一些结果在图 5B 中显示。它们的序列如下：

[0086] SEQ ID NO :18 = TB-A H\_K43Q(TB-A H43)

[0087] SEQ ID NO :19 = TB-A H\_F68V(TB-A H68)

[0088] SEQ ID NO :20 = TB-A H\_F70L/L72R(TB-A H70/72)

[0089] SEQ ID NO :21 = TB-A H\_A76I/S77G(TB-A H76/77)

[0090] SEQ ID NO :22 = TB-A L\_L46R(TB-A L46)

[0091] SEQ ID NO :23 = TB-A L\_R65S(TB-A L65)

[0092] SEQ ID NO :24 = TB-A L\_Y67S(TB-A L67)

[0093] 在优选实施方案中,上述任何 VH 域可以与上述任何 VL 域组合。

[0094] 在本发明的另一个优选实施方案中,TB-A 和 TB-B 的 VL 和 VH 域被改组,使得 TB-A 的 VL 域 (SEQ ID NO :1) 与 TB-B 的 VH 域 (SEQ ID NO :4) 组合,或 TB-B 的 VL 域 (SEQ ID NO :4) 与 TB-A 的 VH 域 (SEQ ID NO :2) 组合。在很优选的实施方案中,scFv 中获得的该改组形式与序列 SEQ IDNO :10 的 (GGGGS)<sub>4</sub>接头连接,分别产生 scFv 抗体 TB-AB (SEQ ID NO :12) 或 TB-BA (SEQ ID NO :13)。所述 (GGGGS)<sub>4</sub>接头可以具有甘氨酸变为更亲水的,即具有极性甚至带电荷氨基酸的氨基酸交换,这可使得该抗体更可溶。这些变异当中,优选具有序列 GRGGS-(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO :39) 的那个。

[0095] TB-B 样序列的 VL 或 VH 域与 TB-A 样序列的 VH 或 VL 域组合也在本发明范围内,这里 TB-B/TB-A 样序列是指该序列与这个相比与另一个更接近。

[0096] 在本发明的又一个优选实施方案中,TB-A VL 和 / 或 VH 序列的 CDR 区中一个或多个氨基酸被改变为与所选 SEQ ID NO :5 的 VL 序列和 / 或 SEQ ID NO :6 或 SEQ ID NO :25 的 VH 中存在的相应氨基酸匹配。很优选的是 VL CDRs (VL CDR2 或 VL CDR3) 和 / 或 VH CDRs (CDR2 或 CDR3) 之一中的改变,最优选的改变分别产生 VL 序列 SEQ ID NO :7 或 SEQ ID NO :8 和 / 或 VH 序列 SEQ ID NO :25 或 SEQ ID NO :9。

[0097] 在本发明的另一个优选实施方案中,VL 序列 SEQ ID NO :26 或 SEQ ID NO :27 与 VH 序列 SEQ ID NO :30 组合。在本发明的又一个优选实施方案中,VL 序列 SEQ ID NO :1 与 VH 序列 SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :29 组合。

[0098] 通常,公开的任何 VL 序列可以与公开的任何 VH 序列组合。

[0099] 本发明的目的是抗体和抗体片段,尤其是 VL 或 VH 多肽、单链抗体 (scFv) 或 Fab 片段。在 scFv 抗体的情况下,选择的 VL 域可以与选择的 VH 域通过柔性接头以二者之一任何方向连接。适当的技术现状接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。在本发明的优选实施方案中,使用序列 ID NO :10 的 (GGGGS)<sub>4</sub>接头或其衍生物 SEQ ID NO :39,但是也可能是 1-3 个重复的变体 (Holliger 等 (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448)。Alfthan 等 (1995.), Protein Eng. 8 :725-731, Choi 等 (2001), Eur. J. Immunol. 31 :94-106, Hu 等 (1996), Cancer Res. 56 :3055-3061, Klpriyanov 等 (1999), J. Mol. Biol. 293 :41-56 和 Roovers 等 (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50 :51-59 描述了本发明可以使用的其他接头。排列可以是 VL-接头-VH 或 VH-接头-VL,前一方向是优选的。

[0100] 在 Fab 片段的情况下,选择的轻链可变域 VL 与人 Ig kappa 链恒定区融合,而适当的重链可变域 VH 与人 IgG 的第一个 (N-末端) 恒定区 CH1 融合。在本发明的示例性实施

方案中,人 C<sub>k</sub>域具有序列 SEQ ID NO :14 和用于构建 Fab 片段的 CH1 域具有序列 SEQ ID NO :15。图 2 显示了 Fab 片段的一个实例,其中使用 TB-A 的 VL 和 VH 域,使得 VL 域直接与人 kappa 恒定域连接,产生序列

[0101] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTG

[0102] VPSRFSGRGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGGQTKLEIKRTVAAPS

[0103] VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST

[0104] YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0105] (SEQ ID NO :1+SEQ ID NO :14)

[0106] 而 VH 域与第一个恒定域 (CH1) 融合,产生序列

[0107] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTG

[0108] PTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELESLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVLT

[0109] VSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSEPVTVSWNSGALTSGVHTFP

[0110] AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCTS

[0111] (SEQ ID NO :2+SEQ ID NO :15).

[0112] 在 C 末端,两个恒定域之间形成链间二硫键。

[0113] 本发明的抗体或抗体衍生物能够具有对人 TNF  $\alpha$  的亲和力,解离常数 K<sub>d</sub>范围是 0.8-10' 000nM。在本发明的优选实施方案中, K<sub>d</sub>  $\leq$  10nM。抗体对抗原的亲和力可以使用合适的方法 (Berzofsky 等 " Antibody-Antigen Interactions " , in Fundamental Immunology, Paul, W. E. , Ed, Rayen Press ;New York, NY(1992) ;Kuby, J. Immunology, W. H. Freeman and Company ;New York, NY) 和其中描述的方法用实验方法测定。

[0114] 在本发明的一个方面,抗体或抗体衍生物,特别是 scFv 或 Fab 片段是标记的。TNF  $\alpha$  特异性抗体或抗体衍生物的可检测标记可以通过将它与酶免疫测定 (EIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 中使用的酶连接来完成,这些测定是本领域技术人员熟知的方法 (例如 Current Protocols Protocols in Immunology, Coligan et al 等 Eds, John Wiley & Sons, 2005)。

[0115] 通过放射性标记 TNF  $\alpha$  特异性抗体或抗体衍生物,有可能通过使用放射免疫测定 (RIA) 检测 TNF- $\alpha$  (参见例如 Work 等, Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, N. Y. (1978)。放射性同位素可以通过使用  $\gamma$  粒子计数器或闪烁计数器或通过放射自显影术来检测。特别有效的同位素是 <sup>3</sup>H、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C, 和优选 <sup>125</sup>I。

[0116] 本发明的抗体或抗体衍生物还可以用荧光标记化合物来标记,如 荧光素、异硫氰酸盐、若丹明、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺,或用化学发光化合物如鲁米诺、异鲁米诺、theromatic acridinium ester、imidazol acridinium 盐和草酸酯。

[0117] 标记和检测方案是本领域技术人员熟知的。例如,它们可以从 Using Antibodies : A Laboratory Manual ;Portable Protocol NO. I (Harlow, E. and Lane, D. , 1998) 获得。

[0118] 标记的本发明的抗体或抗体衍生物在诊断目的中是有用,尤其是检测从患者取出的生物样品中的 TNF  $\alpha$ 。可以使用含有 TNF  $\alpha$  的任何样品,例如生物流体像血液、血清、淋巴、尿、炎症渗出液、脑脊液、羊水、组织提取液或匀浆等等,或用于原位检测的组织学样品。

**[0119] 药物制剂**

**[0120]** 定义:术语“药物制剂”是指处于允许抗体或抗体衍生物的生物活性明确有效的形式,并且不含对将给予该制剂的受试者有毒的另外组分的制剂。“药物可接受”赋形剂(载体、添加剂)是可以合理给予受试哺乳动物以提供有效剂量的所采用活性成分。

**[0121]** “稳定的”制剂是在贮藏时,其中的抗体或抗体衍生物保持它的物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。测定蛋白稳定性的各种分析技术是本领域可获得的,并且在例如 Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) 和 Jones, .A. Adv. Drug Delivery Rev. 10 : 29-90 (1993) 中综述。稳定性可以在选定温度选定时间段进行测定。优选,该制剂在室温(约 30°C)或 40°C 至少 1 个月是稳定的和/或在 2-8°C 至少 1 年或至少 2 年是稳定的。此外,优选该制剂在制剂的冰冻(至例如 -70°C)和融解后是稳定的。

**[0122]** 如果颜色和/或透明度的肉眼检查,或通过紫外线灯散射或大小排阻层析测定,它没有聚集、沉淀和/或变性的迹象,则抗体或抗体衍生物在药物制剂中“保持它的物理稳定性”。

**[0123]** 如果给定时间内的化学稳定性使蛋白被认为仍然保持它的如下限定的生物活性,则抗体或抗体衍生物在药物制剂中“保持它的化学稳定性”。化学稳定性可以通过检测和定量化学上改变的蛋白形式来估计。化学改变可以包括大小修饰(例如修剪),其可以使用例如大小排阻层析、SDS-PAGE 和/或基质辅助的激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI/TOP MS MS)来估计。其他类型的化学改变包括电荷改变(例如作为脱酰胺结果而发生),这可以通过例如离子交换层析估计。

**[0124]** 如果用例如抗原结合试验测定,在给定时间内抗体的生物活性是在药物制剂制备时显示的生物活性的约 10% 内(在试验误差之内),则抗体或抗体衍生物在药物制剂中“保持它的生物活性”。其他的抗体“生物活性”试验在此下面详述。

**[0125]** “等渗的”意思是感兴趣制剂具有基本上与人血液相同的渗透压。等渗制剂通常具有约 250 至 350mOsm 的渗透压。等渗性可以使用例如蒸气压或冰冻型渗透压力计来测定。

**[0126]** “多元醇”是具有多个羟基的物质,包括糖(还原和非还原糖)、糖醇和糖酸。本文优选的多元醇具有小于约 600kD 的分子量(例如在约 120 至约 400kD 的范围内)。“还原糖”是含有可以还原金属离子或与蛋白中的赖氨酸及其他氨基共价反应的半缩醛基的糖,和“非还原糖”是不具备还原糖这些性能的糖。还原糖的实例是果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。非还原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖和棉子糖。甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、苏糖醇、山梨醇和甘油是糖醇的实例。至于糖酸,这些包括 L-葡萄糖酸和它的金属盐。在期望制剂是冻融稳定的制剂的情况下,优选多元醇是不在冰冻温度(例如 -20°C)时结晶致使制剂中抗体不稳定的多元醇。非还原糖如蔗糖和海藻糖是本文优选的多元醇,海藻糖比蔗糖优选,因为海藻糖优异的溶液稳定性。

**[0127]** 在此使用的“缓冲液”是指通过其共轭酸碱组分的作用来抵抗 pH 改变的缓冲溶液。本发明的缓冲液具有约 4.5 至约 6.0 范围的 pH;优选约 4.8 到约 5.5;和最优选具有约 5.0 的 pH。控制 pH 在这个范围内的缓冲液实例包括醋酸盐(例如乙酸钠)、琥珀酸盐(如琥珀酸钠)、葡萄糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐及其他有机酸缓冲液。在期望冻融稳定的制剂的情况下,缓冲液优选不是磷酸盐。

[0128] 在本发明上下文中,在药理学意义上,抗体或抗体衍生物的“治疗有效量”是指有效预防或治疗抗体或抗体衍生物有效治疗的紊乱的量。“疾病/紊乱”是将受益于用该抗体或抗体衍生物治疗的任何状况。这包括慢性和急性紊乱或疾病,包括易于使该哺乳动物引起所述紊乱的那些病理状况。

[0129] “防腐剂”是可以包括在制剂中以实质性地降低其中的细菌作用,由此例如利于生产多用途制剂的化合物。有潜力的防腐剂实例包括氯化十八烷基二甲基苄铵、氯化二甲双铵、苯扎氯铵(氯化烷基苄基二甲基铵的混合物,其中烷基是长链化合物)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳醇类如苯酚、丁基和苯甲基醇、对羟苯甲酸烷基酯如对羟苯甲酸甲酯或丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。本文最优选的防腐剂是苯甲醇。

[0130] 本发明还提供了包含一种或多种抗体或抗体衍生物化合物,和至少一种生理学可接受的载体或赋形剂的药物组合物。药物组合物可以包含例如一种或多种下述物质:水、缓冲液(例如中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)、乙醇、矿物油、植物油、二甲亚砜、碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖)、甘露糖醇、蛋白、助剂、多肽或氨基酸如甘氨酸、抗氧化剂、螯合剂如 EDTA 或谷胱甘肽和/或防腐剂。如上所述,其他活性成分可以(但不必须)包括在本文提供的药物组合物中。

[0131] 载体是可以在给予患者前与抗体或抗体衍生物结合的物质,常常为了控制该化合物的稳定性或生物利用率。在这种制剂内使用的载体通常是生物相容的,并且也可以是生物可降解的。载体包括例如单价或多价分子如血清白蛋白(例如人或牛的),卵白蛋白、肽、聚赖氨酸和多糖如氨基葡聚糖和 polyamidoamines。载体还包括固相支持材料如珠子和微粒,包含例如聚乳酸、聚羟乙酸、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚丙烯酸酯、胶乳、淀粉、纤维素或葡聚糖。载体可以以各种方式承载化合物,包括共价键合(直接或通过接头基团)、非共价作用或混合。

[0132] 药物组合物可以配制成用于任何适合的给药方式,包括例如局部、口服、鼻内、直肠或肠胃外给药。在某些实施方案中,优选以适于口服使用的形式的组合物。这种包括例如丸剂、片剂、锭剂、糖锭、水或油悬浮剂、可分散性粉剂或粒剂、乳剂、硬或软胶囊或糖浆或酞剂。又在其它实施方案中,本文提供的组合物可以冻干物配制。本文使用的术语胃肠外包括皮下、皮内、血管内(例如静脉内)、肌内、脊柱、颅内、鞘内和腹膜内注射,以及任何相似的注射或输注技术。

[0133] 为用于口服使用的组合物可以根据本领域已知的制备药物组合物的任何方法来制备,和为了提供吸引人和可口的制剂,可以含有一种或多种试剂,如甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂。片剂含有与适于制备片剂的生理学可接受赋形剂混合的活性成分。这种赋形剂包括例如惰性稀释剂(例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠)、成粒剂和崩解剂(例如玉米淀粉或藻酸)、粘合剂(例如淀粉、明胶或阿拉伯胶)和润滑剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉)。该片剂可以是无包衣的或它们可以通过已知技术被包衣,以延迟崩解和在胃肠道吸收,由此提供较长时间的持续作用。例如,可以使用时间延迟材料如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0134] 口服使用的制剂也可以以硬明胶胶囊存在,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合,或以软明胶胶囊存在,其中活性成分与水或油性介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。水悬剂含有抗体或抗体衍生物,与适于制备水悬

剂的赋形剂混合。这种这种赋形剂包括悬浮剂（例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄耆树胶和阿拉伯树胶）；和分散或湿润剂（例如天然存在的磷脂如卵磷脂，亚烷基氧化物与脂肪酸的缩合产物，如聚氧化乙烯硬脂酸，乙烯氧化物与长链脂族醇的缩合产物，如 heptadecaethyleneoxycetanol，环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物如聚氧化乙烯山梨醇一油酸酯，或环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物如聚乙烯失水山梨醇一油酸酯）。水悬剂也可以包含一种或多种防腐剂，例如间羟基苯酸乙基或正丙基酯，一种或多种着色剂、一种或多种调味剂和和一种或多种甜味剂如蔗糖或糖精。糖浆和酞剂可以与甜味剂一起配制，如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖。这种制剂也可以包含一种或多种缓和剂、防腐剂、调味剂和 / 或着色剂。

[0135] 油悬剂可以通过将活性成分悬浮于植物油（例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油）或矿物油如液体石蜡中来配制。油悬剂可以含有增稠剂如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以添加甜味剂如上列出的那些，和 / 或调味剂以提供可口的口服制剂。这种悬剂可以通过添加抗氧化剂如抗坏血酸来保存。

[0136] 适于添加水制备水悬剂的可分散性粉剂和粒剂提供了与分散或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。合适的分散或湿润剂和悬浮剂由上面已经提及的来举例。也可以存在另外的赋形剂例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0137] 药物组合物也可以是水包油乳剂。该油相可以是植物油（例如橄榄油和花生油）、矿物油（例如液体石蜡）或它们的混合物。合适的乳化剂包括天然存在的树胶（例如阿拉伯树胶或黄耆树胶）、天然存在的磷脂（例如大豆、卵磷脂和来源于脂肪酸和己糖醇的酯或偏酯）、酐（例如失水山梨糖一油酸酯）和来源于脂肪酸和己糖醇的偏酯与环氧乙烷的缩合产物（例如聚氧化乙烯失水山梨糖一油酸酯）。乳剂也可以包含一种或多种甜味剂和 / 或调味剂。

[0138] 药物组合物可以制备成无菌注射水悬剂或油悬剂，根据使用的载体和浓度，其中的调节剂悬浮或溶于该载体。可以根据已知技术，使用合适的分散、湿润剂和 / 或悬浮剂如上述的那些，配制这种组合物。可以使用的可接受载体和溶剂是水、1,3-丁二醇、Ringer's 溶液和等渗氯化钠溶液。此外，可以使用无菌固定油类作为溶剂或悬浮介质。为了这个目的，可以使用任何温和固定油类，包括合成的甘油单或二酯。此外，可注射组合物的制备中可以使用脂肪酸如油酸，且助剂如局部麻醉剂、防腐剂和 / 或缓冲剂可以溶于该载体。

[0139] 药物组合物可以配制成持续释放制剂（即制剂如胶囊，给药后引起调节剂缓慢释放）。这种制剂通常可以使用熟知技术来制备，和通过例如口服、直肠、皮下植入，或通过植入期望靶部位来给予。这种制剂中使用的载体是生物相容的，和也可以是生物可降解的；优选该制剂提供相对恒定水平的调节剂释放。持续释放制剂中含有的抗体或抗体衍生物的量取决于例如植入部位、释放速度和预期持续时间和待治疗或预防的疾病 / 紊乱的性质。

[0140] 本文提供的抗体或抗体衍生物通常以在体液（例如血液、血浆、血清、CSF、滑膜液、淋巴、细胞间液、泪液或尿液）中达到足以可检测地结合 TNF $\alpha$  和预防或抑制与 TNF $\alpha$  相关的疾病 / 紊乱的浓度的量给予。如果一种剂量产生如本文描述的可辨别的患者益处，则该剂量被认为是有效的。优选的全身剂量范围从每天每公斤体重约 0.1mg 至约 140mg（每

天每一患者约 0.5mg 至约 7g),口服剂量通常比静脉内剂量高大约 5-20 倍。可能与载体材料结合以产生单一剂型的抗体或抗体衍生物的量将根据治疗的宿主和特定给药方式而变化。剂量单位形式通常将含有从约 1mg 至约 500mg 之间的活性成分。

[0141] 药物组合物可以为治疗对针对 TNF- $\alpha$  的抗体或抗体衍生物反应的状况而进行包装。包装的药物组合物可以包括容纳有效量的至少一种本文描述的抗体或抗体衍生物和说明书(例如标签)的容器,所述说明书标明含有的组合物将用于治疗给予患者后对一种抗体或抗体衍生物反应的疾病/紊乱。

[0142] 本发明的抗体或抗体衍生物还可以被化学修饰。优选的修饰基团是聚合物,例如任选取代的直或支链聚烯烃、polyalkenylene 或聚氧化亚烷基聚合物或分支或不分支多糖。这种效应基团可以增加抗体在体内的半衰期。合成聚合物的具体实例包括任选取代的直或支链聚(乙二醇)(PEG)、聚(丙二醇)、聚(乙烯醇)或它们的衍生物。具体天然存在的聚合物包括乳糖、直链淀粉、葡聚糖、糖原或它们的衍生物。聚合物的大小可以根据需要变化,但是通常是范围从 500Da 至 50000Da 的平均分子量。对于设计抗体穿透组织的局部应用,优选的聚合物分子量是大约 5000Da。聚合物分子可以与抗体连接,尤其是通过共价连接的铰链肽与 Fab 片段重链 C 末端连接,如 W00194585 所述。对于 PEG 部分的连接,参考 Poly(ethyleneglycol)Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris(编), Plenum Press, New York 和 "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam 和 A. Dent, Grove Publishers, New York。

[0143] 制剂的制备

[0144] 制备了如上所述的感兴趣抗体或抗体衍生物后,制备含有它的药物制剂。待配制的抗体没有经受在先的冻干,在此的感兴趣制剂是含水制剂。优选制剂中的抗体或抗体衍生物是抗体片段,如 scFv。制剂中存在的抗体的治疗有效量通过考虑例如期望的剂量体积和给药方式来确定。从约 0.1mg/ml 至约 50mg/ml,优选约 0.5mg/ml 至约 25mg/ml 和最优选约 2mg/ml 至约 10mg/ml 是制剂中示例的抗体浓度。

[0145] 在 pH 缓冲溶液中制备包含抗体或抗体衍生物的含水制剂。本发明的缓冲液具有约 4.5 至约 6.0 范围的 pH,优选约 4.8 到约 5.5,和最优选具有约 5.0 的 pH。控制 pH 在这个范围之内缓冲液实例包括醋酸盐(例如乙酸钠)、琥珀酸盐(如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐及其他有机酸缓冲液。缓冲液浓度可以从约 1mM 至约 50mM,优选从约 5mM 至约 30mM,根据例如缓冲液和期望的制剂等渗性而定。优选缓冲液是乙酸钠(约 10mM), pH 5.0。

[0146] 发挥促进张力(tonicifier)作用并可以稳定抗体的多元醇包括在制剂中。在优选实施方案中,制剂不含促进张力(tonicifying)量的盐,如氯化钠,因为这可能引起抗体或抗体衍生物沉淀和/或可以导致低 pH 下氧化。在优选实施方案中,多元醇是非还原糖,如蔗糖或海藻糖。多元醇可以相对于期望的制剂等渗性而变化的量添加至制剂。优选含水制剂是等渗的,在这种情况下制剂中多元醇的合适浓度是例如约 1%至约 15% w/v,优选约 2%至约 10% w/v。然而,高渗或低渗制剂也可能是合适的。添加的多元醇的量也可以相对于多元醇分子量而改变。例如,可以添加与二糖(如海藻糖)相比量降低的单糖(例如甘露糖醇)。

[0147] 表面活性剂也添加至抗体或抗体衍生物制剂中。示例的表面活性剂包括非离子型表面活性剂如聚山梨酯 (polysorbates) (例如聚山梨酯 20、80 等) 或泊洛沙姆 (例如泊洛沙姆 188)。添加的表面活性剂的量使得它降低配制的抗体 / 抗体衍生物的聚集和 / 或尽量减少制剂中微粒的形成和 / 或降低吸附。例如, 表面活性剂可以在制剂中以从约 0.001% 至约 0.5%, 优选约 0.005% 至约 0.2% 和最优选约 0.01% 至约 0.1% 的量存在。

[0148] 在一个实施方案中, 制剂含有上述说明的试剂 (即抗体或抗体衍生物、缓冲液、多元醇和表面活性剂) 和基本上无一种或多种防腐剂, 如苯甲醇、苯酚、间甲苯酚、氯丁醇和苄索氯铵。在另一个实施方案中, 制剂中可以包括防腐剂, 尤其是制剂是多剂量制剂时。防腐剂浓度可以从约 0.1% 至约 2%, 最优选约 0.5% 至约 1%。一种或多种其他药物可接受载体、赋形剂或稳定剂如 Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, Osol, A. Ed. (2006) 中描述的那些可以包括在制剂中, 只要它们不会不利地影响制剂的期望特性。可接受的载体、赋形剂或稳定剂是在使用的剂量和浓度下对受体无毒的, 和包括另外的缓冲剂; 助溶剂; 抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 螯合剂如 EDTA; 金属复合物 (例如 Zn- 蛋白复合物); 可生物降解的聚合物如聚酯; 和 / 或成盐平衡离子如钠。

[0149] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这通过在制剂制备前或后通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0150] 制剂的给药

[0151] 该制剂根据已知方法给予需要用该抗体治疗的哺乳动物, 优选人, 如静脉内给药, 一次大剂量或在一段时间内连续输注, 通过肌内的、腹膜内、脑脊髓内 (intracerebrospinal)、皮下、关节内、滑膜腔内、鞘内、口服、局部或吸入途径。在优选实施方案中, 该制剂通过静脉内给药给予哺乳动物。为了这种目的, 可以例如使用注射器或通过 IV 途径注射该制剂。

[0152] 合适的剂量 (“治疗有效量”) 的抗体将依赖于例如待治疗的状况、状况的严重性和过程、为预防还是为治疗目的给予抗体、先前的治疗、患者临床病史和对抗体的反应、使用的抗体类型和主治医师的辨别力。抗体或抗体衍生物一次或经一系列治疗合适地给予患者, 和可以在从诊断起任何时间给予患者。抗体或抗体衍生物可以作为唯一的治疗给予或与对所讨论的状况有用的其它药物或疗法一起给予。

[0153] 作为一般的建议, 给予的抗体或抗体衍生物的治疗有效量在每公斤患者体重约 0.1 至约 50mg/kg 的范围内, 无论是一次还是多次给药, 使用抗体的典型范围是例如每天给予约 0.3 至约 20mg/kg, 更优选约 0.3 至约 15mg/kg。然而, 其他剂量方案可能有效。这种治疗的进展通过传统方法可容易地监测。

[0154] 制备的产品

[0155] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了制备的产品, 包含容纳本发明的含水药物制剂的容器和任选提供它的使用说明书。合适的容器包括例如瓶、小瓶和注射器。容器可以用各种材料制成, 如玻璃或塑料。示例容器是 3-20cc 一次性使用的玻璃小瓶。可供选择地, 对于多剂量制剂, 容器可以是 3-100cc 玻璃小瓶。容器容纳制剂而容器上或与容器结合的标签可以标明使用指示。制备的产品可以进一步包括从商品化和用户立场期望的其他材料, 包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和带使用说明书的包装插入物。

[0156] 本发明的抗体的产生

[0157] 本发明的抗体或抗体衍生物可以使用重组遗传学领域的常规技术产生。已知多肽的序列,可以通过基因合成产生编码它们的 cDNAs(www.genscript.com)。这些 cDNAs 可以克隆入合适的载体质粒。一旦获得了编码 VL 和 / 或 VH 域的 DNA,可以进行定向诱变获得各种衍生物,例如通过使用诱变引物的 PCR。最好的“开始”序列可以根据 VL 和 / 或 VH 序列中期望改变的数量来选择。优选序列是 TB-A 序列和它的衍生物,例如 scFv 序列或 Fab 融合肽序列可以选择作为 PCR 驱动诱变和 / 或克隆的模板。

[0158] 可以使用本领域技术人员熟知的标准克隆和诱变技术连接接头、改组结构域或构建融合物,用于生产 Fab 片段。公开本发明的一般方法的基本方案在 Molecular Cloning, A Laboratory Manual(Sambrook& Russell, 3<sup>rd</sup> ed.2001) 和 Current Protocols in MolecularBiology(Ausubel 等,1999) 中描述。

[0159] 将承载基因的 DNA 序列——该基因编码 scFv 多肽,或在 Fab 片段的情况下,对于 VL-C<sub>K</sub>和 VH-CH1 融合物,编码两个分开的基因或包含两个基因的双顺反子操纵子(图 2)——克隆在合适的表达载体中,优选具有诱导型启动子的表达载体。必须注意每个基因的前面存在确保翻译的合适核糖体结合位点(图 2 中的 RBS)。应理解本发明的抗体包含公开的序列而不是由它们组成。例如,克隆策略可能要求构建体由在 N 末端存在一个或几个另外残基的抗体构成。具体地说,在没有被翻译后切割的情况下,在最终蛋白中可以存在来源于起始密码子的甲硫氨酸。大部分 scFv 抗体的构建体在 N 末端产生另外的丙氨酸。在本发明的优选实施方案中,选择在大肠杆菌周质表达的表达载体(Krebber,1997)。所述载体在可切割信号序列前包含启动子。然后抗体肽的编码序列符合读框地与可切割信号序列融合。这允许表达的多肽靶向至细菌周质,在其中信号序列被切割。然后抗体折叠。在 Fab 片段的情况下,VL-C<sub>K</sub>和 VH-CH1 融合肽必须与输出信号连接。肽到达周质后,在 C 末端半胱氨酸处形成共价 S-S 键。如果优选抗体在胞质表达,则通常可以从包涵体获得高产量所述抗体,包涵体可以容易地与其他细胞碎片和蛋白分开。在这种情况下,将包涵体溶于变性剂如盐酸胍(GndHCl),然后通过本领域技术人员熟知的复性步骤重折叠。

[0160] 表达 scFv 或 Fab 多肽的质粒被引入合适的宿主,优选细菌、酵母 或哺乳动物细胞,最优选合适的大肠杆菌菌株,对于周质表达,如 JM83,或对于以包涵体表达,如 BL21。可以从周质或包涵体收获多肽并使用标准技术纯化,如本领域技术人员已知的离子交换层析、反相层析、亲和层析和 / 或凝胶过滤。

[0161] 本发明的抗体或抗体衍生物可以用产量、溶解度和体外稳定性表征。对 TNF $\alpha$ , 优选对人 TNF $\alpha$  的结合能力可以通过 ELISA 或表面等离子体共振(BIACore) 使用重组人 TNF $\alpha$  (如 W09729131 所述),进行体外检测,后一方法也允许测定 k<sub>off</sub>速度常数,其应该优选小于 10<sup>-3</sup>S<sup>-1</sup>。优选 K<sub>d</sub>值 $\leq$  10nM。

[0162] 本发明抗体或抗体衍生物的体内中和活性可以使用 L929 细胞毒性试验估计。人重组 TNF $\alpha$  以浓度依赖性方式对培养的小鼠 L929 成纤维细胞发挥细胞毒性作用。这种 TNF $\alpha$  诱导的细胞毒性可以通过 TNF $\alpha$  中和抗体抑制(D Ö ring,1994)。优选的相对于最大抑制浓度一半的 IC<sub>50</sub>值 $\leq$  100ng ml<sup>-1</sup>。

[0163] TNF $\alpha$  在各种人类疾病中具有被证实的病理生理作用,尤其是炎症性紊乱、免疫和免疫调节的紊乱、引起脓毒性、内毒素性和心血管性休克的感染、神经变性疾病和恶性病。由于怀疑 TNF $\alpha$  在稳定增长数量的另外人类疾病中起着与疾病相关的作用,因此难以给出

也确保 TNF $\alpha$  抑制剂未来临床应用范围的完整说明的指征全面列表。因此,本发明的抗体或抗体衍生物可以应用于治疗下列目录中所列疾病,其不被认为是完整或排他的列表。也包括没有具体提及的直接或间接受 TNF $\alpha$  影响的其他疾病。

[0164] 自身免疫或慢性炎症:

[0165] 一般的炎症慢性和 / 或自身免疫状态、一般的免疫介导的炎性紊乱、炎性 CNS 病、影响眼睛、关节、皮肤、粘膜、中枢神经系统、胃肠道、泌尿道或肺的炎性疾病、一般的眼色素层炎状态、视网膜炎、HLA-B27+ 眼色素层炎、Behcet 氏病、干眼综合征、青光眼、干燥综合征 (Sjögren syndrome)、糖尿病 (包括糖尿病神经病变)、胰岛素抵抗、一般的关节炎状态、类风湿性关节炎、骨关节炎、反应性关节炎和瑞特氏综合征 (Reiter's syndrome)、少年关节炎、强直性脊柱炎、多发性硬化、格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome)、重症肌无力、肌萎缩性侧索硬化、结节病、肾小球性肾炎、慢性肾病、膀胱炎、银屑病 (包括牛皮癣关节炎)、化脓性汗腺炎、脂膜炎、坏疽性脓皮病、SAPHO 综合征 (滑膜炎、痤疮、脓疱病、骨肥大和骨炎)、痤疮、Sweet 综合征、天疱疮、克罗恩病 (包括肠外表现)、溃疡性结肠炎、支气管哮喘、过敏性肺炎、一般的变态反应、过敏性鼻炎、过敏性鼻炎、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肺部纤维化、Wegener 肉芽肿病、川崎综合征、巨细胞性动脉炎、Churg-Strauss 血管炎、结节性多动脉炎、烧伤、移植物抗宿主疾病、宿主抗移植物反应、器官或骨髓移植后排斥发作、一般的全身或局部血管炎状态、系统性和盘状红斑狼疮、多发性肌炎和皮肌炎、硬皮病、先兆子痫、急性和慢性胰腺炎、病毒性肝炎、酒精性肝炎。

[0166] 急性炎症和 / 或预防术后或外伤后炎症和疼痛:

[0167] 预防一般的术后炎症、眼手术 (例如白内障 (眼晶体置换) 或青光眼手术)、关节手术 (包括关节镜手术)、关节相关结构 (例如韧带) 的手术、口腔和 / 或牙科手术、最低限度的介入心血管程序 (例如 PTCA、经皮腔内斑块旋切术 (atherectomy)、放置支架)、腹腔镜和 / 或内窥镜腹内和妇科程序、内窥镜泌尿科程序 (例如前列腺手术、输尿管镜检查、膀胱镜检查、间质性膀胱炎)、一般的手术前后炎症 (预防)。

[0168] 神经病和神经变性疾病:

[0169] 阿尔茨海默病 (Alzheimer disease)、帕金森氏病、亨廷顿舞蹈病、贝尔麻痹 (Bell's palsy)、克-雅病 (Creutzfeldt-Jakob disease)。

[0170] 癌症:

[0171] 癌症相关骨质溶解、癌症相关炎症、癌症相关疼痛、癌症相关恶病质、骨转移。

[0172] 疼痛:

[0173] 急性和慢性形式的疼痛,无论这些是由 TNF $\alpha$  的中枢还是外周作用引起的和无论它们被分为炎性、伤害性还是神经性形式的疼痛、坐骨神经痛、腰背痛、腕管综合征、复杂性区域疼痛综合征 (CRPS)、痛风、带状疱疹后神经痛、纤维肌痛、局部疼痛状态、由于转移性肿瘤引起的慢性疼痛综合征、dysmenorrhea。

[0174] 感染

[0175] 细菌、病毒或真菌性脓毒症、结核、AIDS。

[0176] 心血管疾病:

[0177] 动脉粥样硬化、冠状动脉病、高血压、血脂障碍 (dyslipidemia)、心功能不全和慢性心力衰竭。

[0178] 在本发明的优选实施方案中,用本发明的抗体或抗体衍生物可以达到治疗骨关节炎或眼色素层炎或炎症性肠病。

[0179] 本发明还提供了一种药物组合物,包含本发明的抗体或抗体衍生物分子与药物可接受赋形剂、稀释剂或载体结合。

[0180] 该药物组合物优选应包含治疗有效量的本发明抗体,即治疗、改善或预防与 TNF  $\alpha$  相关的疾病或状况,或显示可检测的治疗或预防效果所需要的量的所述抗体。治疗有效剂量可以以细胞培养试验或动物模型来估计,通常以啮齿类、兔、狗、猪或灵长类动物。动物模型也可以用于测定合适的浓度范围和给药途径。观察本发明抗体或抗体衍生物作用的合适动物模型是大鼠急性单关节炎 (monoarthritis) 模型 (Bolon 等 (2004), *Vet. Pathol.* 41 : 235-243。人 TNF  $\alpha$  通过关节内注入大鼠膝关节,在注射关节引起急性、自限性单关节炎。抗 TNF  $\alpha$  抗体 (衍生物) 的生物活性可以通过降低 TNF  $\alpha$  诱导的膝关节肿胀和或降低炎症组织学参数来定量。

[0181] 由于本发明的抗体或抗体衍生物是高度可溶的,因此高抗体浓度 (60mg ml<sup>-1</sup>或更高) 允许应用的体积小。

[0182] 本发明的抗体或抗体衍生物可以应用在期望降低存在于人或动物体中的具有生物活性的 TNF  $\alpha$  水平的任何治疗中。TNF  $\alpha$  可以在体内循环或以不期望的高水平局限性存在于体内特殊部位。本发明提供了一般全身以及局部应用的方式,它包括但不限于下列那些:口服应用、静脉内、皮下、肌内、关节内、玻璃体内、真皮内、或实质内注射、气雾剂吸入、局部应用于皮肤、粘膜或眼睛、通过可植入微型泵全身或局部释放或通过通过允许延迟释放的可植入制剂/装置局部释放、局部应用于浆膜表面、鞘内或室内应用、以允许在胃肠道所选部分的控制管腔内释放的制剂口服、从足够的制剂/装置 (例如支架) 局部血管内释放、局部输送至尿囊肿、局部管腔内释放 (例如释放入胆道、输尿管),或通过内窥镜装置局部输送,或从隐形眼镜释放 (接触)。优选的应用是局部应用,如关节内注射或局部应用,例如应用至眼睛中。对于二种优选应用,本发明的抗体需要处于溶液中。

[0183] 本发明也揭示本发明抗体或抗体衍生物用于生产治疗与 TNF  $\alpha$  相关疾病的药物的用途。在这种情况下,抗体或抗体衍生物包含在治疗组合物中。所述组合物用作药物,最优选用于预防或治疗与 TNF  $\alpha$  相关的疾病。

[0184] 在另一个方面,本发明的 scFv 抗体用于基因治疗,尤其是过继性 (adoptive) 细胞基因治疗。自身免疫紊乱表示对准自身组织的不适当的免疫反应。抗原特异性 CD4+T 细胞和抗原呈递树突细胞 (DCs) 是自身免疫性疾病发病机理中重要的介质,并因此是过继性细胞基因治疗、离体治疗性基因转移方法的理想候选物。使用逆转录病毒转导细胞和萤光素酶生物发光, Tarner 等 (2003, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 998 :512-519) 证明了在多发性硬化、关节炎和糖尿病动物模型中,原代 T 细胞、T 细胞杂交瘤和 DCs 快速和优先到达炎症部位。用驱动各种“调节蛋白”如白介素和抗 TNF scFv 表达的逆转录病毒载体转导的这些细胞将这些免疫调节蛋白输送至发炎损害部位,对于实验性自身免疫性脑炎、胶原诱导的关节炎和非肥胖糖尿病小鼠提供治疗。本发明抗体或抗体衍生物的稳定和可溶构架区特别适于胞内递送抗原,例如当抗体或抗体衍生物从合适的逆转录病毒载体携带的转基因表达时。过继性细胞基因治疗引起抗 TNF  $\alpha$  scFv 局部表达和分泌。Smith 等 (2003) 证明了来源于 TNF  $\alpha$  中和单克隆抗体的 scFvs (i) 可以体外中和 TNF  $\alpha$  和 (ii) 改变细胞因子在罹患胶原诱导的

关节炎的小鼠关节局部而不是全身的表达模式。可供选择地,允许抗 TNF $\alpha$  scFv 抗体连续表达的合适载体(例如病毒)直接全身或局部注射被认为是另一种可能的基因治疗方法。

[0185] 本发明的序列是下列序列:

[0186] SEQ ID NO :1 TB-A 的 VL

[0187] DIVMTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK

[0188] LLIYSAENRYTGVPSRFSGRGTDFLTITSSLPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT

[0189] KLEVKR

[0190] SEQ ID NO :2 TB-A 的 VH

[0191] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHYGMNWRQAPGKGL

[0192] EWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCAREERGD

[0193] AMDYWGQGLVTVSS

[0194] SEQ ID NO :3 TB-B 的 VL

[0195] DIVLTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK

[0196] RLIYSAFNRYTGVPSRFSGSGTEFTLTITSSLPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT

[0197] KIEVKR

[0198] SEQ ID NO :4 TB-B 的 VH

[0199] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYSFTHYGMNWRQAPGQGL

[0200] EWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTLTRDTSIGTVYMELTSLTSDDTAVYYCAREERGD

[0201] AMDYWGQGLVTVSS

[0202] SEQ ID NO :5 FW2.3 的 VL

[0203] DIVLTQSPSSLSASVGDVTLTCRASQGI RNELAWYQQRPGKAPK

[0204] RLIYAGSILQSGVPSRFSGSGTEFTLTITSSLPEDVAVYYCQQYYSLPYMFQGT

[0205] KLEVKR

[0206] SEQ ID NO :6 FW2.3 的 VH

[0207] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYSFTGYFLHWVRQAPGQGL

[0208] EWMGRINPDSGDTIYAQKFQDRVTLTRDTSIGTVYMELTSLTSDDTAVYYCARVPRG

[0209] TYLDPWDYFDYWGQGLVTVSS

[0210] SEQ ID NO :7 TB\_L2 的 VL

[0211] DIVMTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK

[0212] LLIYAGSILQSGVPSRFSGRGTDFLTITSSLPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT

[0213] KLEVKR

[0214] SEQ ID NO :8 TB\_L3 的 VL

[0215] DIVMTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK

[0216] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGTDFLTITSSLPEDVAVYYCQQYYSLPYMFQGT

[0217] KLEVKR

[0218] SEQ ID NO :9 TB\_H2 的 VH

[0219] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHYGMNWRQAPGKGL

[0220] EWMGRINPDSGDTIYAQKFQDRFTFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCAREERGD

[0221] AMDYWGQGLVTVSS

- [0222] SEQ ID NO :10 接头  
[0223] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS  
[0224] SEQ ID NO :11 TB-B R46L 的 VL  
[0225] DIVLTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0226] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0227] KLEVKR  
[0228] SEQ ID NO :12 TB-AB  
[0229] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0230] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0231] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH  
[0232] YGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTLTRDTSIGTVYMELTSLS  
[0233] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS  
[0234] SEQ ID NO :13 TB-BA  
[0235] DIVLTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0236] RLIYSAFNRYTGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0237] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH  
[0238] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELTSLS  
[0239] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS  
[0240] SEQ ID NO :14 Fab 的 C $\kappa$   
[0241] TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA  
[0242] LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
[0243] RGEN  
[0244] SEQ ID NO :15 Fab 的 CH1  
[0245] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSEPVTVSWNSGA  
[0246] LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS  
[0247] CTS  
[0248] SEQ ID NO :16 TB-wt 的 VL  
[0249] DIVMTQTPKFLLSAGDRVITCTASQSVSNDVVWYQQKPGQSPK  
[0250] MLMYSAFNRYTGVPPDRFTGRGYGTDFTFITISVQAEDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGT  
[0251] KLEIKR  
[0252] SEQ ID NO :17 TB-wt 的 VH  
[0253] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYGMNWVKQAPGKGL  
[0254] KWMGWINTYTGEPTYADDFKEHFAFSLETSASTVFLQINNLKNETATYFCARERGD  
[0255] AMDYWGQGTSVTVSS  
[0256] SEQ ID NO :18 TB-A H<sub>43</sub>Q, 也称 TB-A H43  
[0257] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0258] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0259] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH  
[0260] YGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELTSLS

- [0261] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0262] SEQ ID NO :19 TB-A H\_F68V, 也称 TB-A H68
- [0263] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDDVWYQQRPGKAPK
- [0264] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0265] KLEVKRGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0266] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTFSLTSASTVYMELTSLS
- [0267] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0268] SEQ ID NO :20 TB-A H\_F70L/L72R, 也称 TB-A H70/72
- [0269] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDDVWYQQRPGKAPK
- [0270] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0271] KLEVKRGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0272] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTLSRETSASTVYMELTSLS
- [0273] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0274] SEQ ID NO :21, TB-A H\_A76I/S77G, 也称 TB-A H76/77
- [0275] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDDVWYQQRPGKAPK
- [0276] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0277] KLEVKRGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0278] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTSLETSGITVYMELTSLS
- [0279] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0280] SEQ ID NO :22 TB-A L\_L46R, 也称 TB-A L46
- [0281] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDDVWYQQRPGKAPK
- [0282] RLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0283] KLEVKRGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0284] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTSLETSSASTVYMELTSLS
- [0285] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0286] SEQ ID NO :23 TB-A L\_R65S, 也称 TB-A L65
- [0287] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDDVWYQQRPGKAPK
- [0288] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0289] KLEVRGGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0290] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTSLETSSASTVYMELTSLS
- [0291] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0292] SEQ ID NO :24 TB-A L\_Y67s, 也称 TB-A L67
- [0293] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDDVWYQQRPGKAPK
- [0294] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0295] KLEVKRGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0296] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTSLETSSASTVYMELTSLS
- [0297] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0298] SEQ ID NO :25 含 D66G 的 TB-A 的 VH
- [0299] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTHYGMNWVRQAPGKGL

- [0300] EWMGWINTYTGEPTYADKFKGRFTFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGD  
[0301] AMDYWGQGLVTVSS  
[0302] SEQ ID NO :26 含 V83F 的 TB-A 的 VL  
[0303] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0304] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0305] KLEVKR  
[0306] SEQ ID NO :27 含 V83A 的 TB-A 的 VL  
[0307] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0308] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISSLQPEDAAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0309] KLEVKR  
[0310] SEQ IDNO :28TB-A 的 VH H43/70/71/73/77  
[0311] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGL  
[0312] EWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTLTLDTSAGTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGD  
[0313] AMDYWGQGLVTVSS  
[0314] SEQ ID NO :29TB-A 的 VH H43/70/71  
[0315] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGL  
[0316] EWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTLTLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGD  
[0317] AMDYWGQGLVTVSS  
[0318] SEQ ID NO :30 TB-A 的 VH  
[0319] H11/16/43/66/70/71/73/77/93/112  
[0320] QVQLVQSGAEDKKPGGSVKVSCTASGYTFTHYGMNWVRQAPGQGL  
[0321] EWMGWINTYTGEPTYADKFKGRFTLTLDTSAGTVYMELTSLTSDDTATYYCARERGD  
[0322] AMDYWGQGTSVTVSS  
[0323] SEQ ID NO :31 TB-A H\_M48L/F68I  
[0324] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0325] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0326] KLEVKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTH  
[0327] YGMNWVRQAPGKGLEWLGWINTYTGEPTYADKFKDRIFTSLETSASTVYMELTSLTS  
[0328] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS  
[0329] SEQ ID NO :32 TB-A L\_V83E H\_V79A  
[0330] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0331] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISSLQPEDEAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0332] KLEVKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTH  
[0333] YGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPTYADKFKDRIFTSLETSASTAYMELTSLTS  
[0334] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS  
[0335] SEQ ID NO :33 TB-A 接头 \_G2R H\_F68L  
[0336] DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK  
[0337] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT  
[0338] KLEVKRGRGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTH

- [0339] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRLTFSLETSASTVYMELTSLS
- [0340] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0341] SEQ ID NO :34 TB-A H\_K43R/F68I
- [0342] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK
- [0343] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0344] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0345] YGMNWVRQAPGRGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRITFSLETSASTVYMELTSLS
- [0346] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0347] SEQ ID NO :35 TB-A\_H F68L
- [0348] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK
- [0349] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0350] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0351] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRLTFSLETSASTVYMELTSLS
- [0352] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0353] SEQ ID NO :36 TB-A H\_F68A
- [0354] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK
- [0355] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0356] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0357] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRATFSLETSASTVYMELTSLS
- [0358] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0359] SEQ ID NO :37 TB-A H\_F68V/F70L
- [0360] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK
- [0361] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0362] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0363] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTLTFSLETSASTVYMELTSLS
- [0364] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0365] SEQ ID NO :38 TB-A H\_F70L
- [0366] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK
- [0367] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0368] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0369] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTLSLETSASTVYMELTSLS
- [0370] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLVTVSS
- [0371] SEQ ID NO :39 接头 G2R
- [0372] GRGGSGGGSGGGSGGGSS
- [0373] SEQ ID NO :40 TB-A
- [0374] DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPK
- [0375] LLIYSAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGT
- [0376] KLEVKRGGGGSGGGSGGGSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYTFTH
- [0377] YGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELTSLS

[0378] DDTAVYYCARERGDAMDYWGQGTLVTVSS

[0379] 参考下列实施例将更充分理解本发明。然而它们不应被认为是限制本发明的范围。所有参考文献和专利引证在此引入作为参考。

[0380] 实验 1 :scFv 抗体的构建

[0381] 用于产生人源化抗人 TNF $\alpha$  抗体或抗体衍生物,如单链片段(scFv)或 Fab 片段的起始原料是鼠单克隆抗体 Di62。Döring 等(1994, Mol. Immunol. 31 :1059-1067) 中公开了轻链和重链可变区的序列。在同一出版物中也探讨了 this 单克隆抗体的性能。简言之, Di62 以浓度依赖性方式特异性结合人 TNF $\alpha$ 。它是高亲和力抗体(Kd = 0.4nM) 并可以阻断 TNF $\alpha$  结合其受体。此外,在小鼠 L929 细胞中, Di62 抑制人 TNF $\alpha$  诱导的细胞毒性。

[0382] 根据它的公开序列,构建 VL- 接头 -VH 方向的单链抗体衍生物(scFv)形式的 Di62,其中接头序列包含四个重复的四个甘氨酸和一个丝氨酸残基(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>。在此,这个 scFv 被称为 TB-wt, VL 是 SEQ ID NO :16 而 VH 是 SEQ ID NO :17。

[0383] 为了 a) 使抗体衍生物与人序列更相似以减小潜在的免疫原性,和 b) 使它更稳定和可溶的目的而人源化这个抗体衍生物,为此, TB-wtCDR 序列移植在稳定和可溶的人构架区上(Auf der der Maur 等(2001), FEBS Lett. 508 :407-412 ;Auf der Maur 等(2004), Methods 34 :215-224)。人 VL-kappa 亚型 I 和 VH 亚型 I 被鉴定为最接近人的亚族。从人 VL 和 VH 序列库选择合适的受体构架区,选择有利的生物化学和生物物理学性能,例如稳定性、溶解度和表达性能的那些(Auf der Maur, 等(2001), FEBS Lett. 508 :407-412 ;Auf der Maur, 等(2004), Methods 34 :215-224)。W003097697/EP1506236 中描述了这些抗体构架区的分离和性能。从这个库,抗原结合性能不明确的单链抗体构架区被确定为合适的受体。这个受体由人 VL-kappa I 结构域(SEQ ID NO :5) 与人 VH I 结构域(SEQ ID NO :6) 结合组成。在本文中,这个受体构架区被称为 FW2.3。81 个 VL 构架区残基当中, TB-wt 和 FW2.3 共享 55 个相同的氨基酸残基,折合 67% 同一性。在 87 个 VH 构架区残基当中, TB-wt 和 FW2.3 具有 55 个相同的残基,折合 63% 同一性。这两个单链抗体衍生物都具有相同的 CDR 长度,除了 VH-CDR3,它在 FW2.3 中较长。对于两个 scFvs, CDR 残基内的氨基酸组成是不同的。描述了将抗体可变域人源化的各种方法(Riechmann 等(1998), Nature 332 :323-327 ;Padlan, E. A. (1991). Mol. Immunol. 28 :489-498 ;Roguska 等(1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :969-973 ;Gonzales 等(2005), Tumor Biol. 26 :31-43 ;Ewert, S., 等(2004), Methods 34 :184-199)。首先进行最低限度的方法,即全部小鼠 CDR 环从 TB-wt 保守性转移到 FW2.3 上。产生的 scFv 被称为 TB-B 并具有 SEQ ID NO :3 的 VL 序列和 SEQ ID NO :4 的 VH 序列。根据 Kabat 编号方案定义 TB-wt 中的 CDR- 环(Kabat 等(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup>Ed, Natl. Inst. Health, Bethesda, MD) 并限定下列残基(见图 1) :

[0384] VL

[0385] CDR1 :L24-L34(相同的 Kabat 编号)

[0386] CDR2 :L50-L56(相同的 Kabat 编号)

[0387] CDR3 :L89-L97(相同的 Kabat 编号)

[0388] VH

[0389] CDR1 :H31-H35(相同的 Kabat 编号)

[0390] CDR2 :H50-H66 (Kabat 编号 H50-H65)

[0391] CDR3 :H99-H106 (Kabat 编号 H95-H102)。

[0392] 这个抗体不能有效地结合 TNF  $\alpha$  (图 4A)。下一步是测定这些组分的哪个残基或哪些残基应被置换以优化产生的人源化抗体的性能。

[0393] 由于用其他氨基酸置换人氨基酸残基应该减至最少,因为外来氨基酸序列的引入增加抗体或抗体衍生物在人的免疫原性风险 (Gonzales 等 (2005), *Tumor Biol.* 26 : 31-43,因此构建几个变体。构建所述变体之一在此称为 TB-B L46 (VL SEQ ID NO :11 ;VH SEQ IDNO :4),旨在将免疫原性风险降至最小,但仍显示出足够的结合活性。这个变体基于 TB-B 并在 VL 第 46 位含有一个单氨基酸改变,即 R  $\rightarrow$  L。这个氨基酸位于轻链上部核心内并参与二聚体界面。它参与限定 L-CDR1 的构象并对 VH/VL 包装有影响。据报导亮氨酸残基在这个特殊位置有利 (PCT/US03/19333)。与 TB-B 相比,scFv TB-B L46 保留了一些 TNF  $\alpha$  特异性结合 (图 4A ; $K_d \approx 100\text{nM}$ )。

[0394] 为了进一步提高 TNF  $\alpha$  - 结合活性,在 VL 残基 4、46、65、67、70 和 / 或 VH 残基 28、43、68、70、71、72、73、76、77 中一个或多个位置进行一个或多个更多交换。在此,在全部位置具有交换的变体被称为 TB-A (VL SEQ ID NO :1 ;VH SBQ ID NO :2)。

[0395] 此外,关于本发明的特定抗 TNF  $\alpha$  抗体,用来源于 L-CDR1 和 L-CDR2 的肽进行的竞争试验表明两个 CDR 环对于 scFv 与抗原的结合都是重要的 (D  $\ddot{\text{O}}$  ring 等 (1994), *Mol. Immunol.* 31 :1059-1067)。

[0396] 在旨在将保留结合所需非人残基数量减至最少和优化生物物理学性能 (稳定性和溶解度) 的进一步实验中,应用系统诱变和结构域改组,以阐明小鼠和人源化 VL 和 VH 域之间的功能差异。

[0397] 通过结构域改组获得两个变体。第一个变体包含来自 TB-A 的 VL 域,通过甘氨酸丝氨酸接头 (SEQ ID NO :10) 与来自 TB-B 的 VH 域连接,产生 TB-AB (SEQ ID NO :12)。第二个变体, TB-BA 是第一个变体的反向,即, VL 域来自 TB-B,与 TB-A 的 VH 域结合 (SEQ ID NO :13)。

[0398] 通过 TB-A 的系统诱变产生另外的变体。图 1 显示了 TB-A 和 TB-B 的 VL 和 VH 序列的序列比较。TB-A 和 TB-B 之间总共 14 个构架区残基不同 (星号)。它们中仅五个——VL 残基 4 和 70 和 VH 残基 28、71 和 73 在大小和性能上显示出较小的差异,因此在这一点上没有考虑用来诱变。下列构架区位置被来自 TB-B 的相应氨基酸取代。TB-A 的这些单或双突变体如下 :

[0399] TB-A H43            K  $\rightarrow$  Q            交界面 (SEQ ID NO :18)

[0400] TB-A H68            F  $\rightarrow$  V            外环 VH (SEQ ID NO :19)

[0401] TB-A H70/72        F  $\rightarrow$  L, L  $\rightarrow$  R    外环 VH (SEQ ID NO :20)

[0402] TB-A H76/77        A  $\rightarrow$  I, S  $\rightarrow$  G    外环 VH (SEQ ID NO :21)

[0403] TB-A L46            L  $\rightarrow$  R            交界面 (SEQ ID NO :22)

[0404] TB-A L65            R  $\rightarrow$  S            外环 VL (SEQ ID NO :23)

[0405] TB-A L67            Y  $\rightarrow$  S            外环 VL (SEQ ID NO :24)

[0406] 很多因素可以影响抗体或抗体衍生物的免疫原性 (Gonzales 等 (2005), *Tumor Biol.* 26 :31-43)。为进一步降低人源化 TB-A scFv 可变区的非人内容,用来自 FW2.3 的相

应的人 CDR 环交换鼠 VL CDR2 和 CDR3 环和鼠 VH CDR2 环。所产生的构建体在此分别称为 TB\_L2(SEQ ID NO :7)、TB\_L3(SEQ ID NO :8) 和 TB\_H2(SEQ ID NO :9)。

[0407] 通过基因合成产生编码鼠单链形式单克隆抗体 Di62 和两个人源化形式 TB-B 和 TB-A 的 cDNAs(www.genscript.com)。标准克隆程序后通过 PCR 驱动的位点定向诱变引入其他变异体中的全部点突变 (TB-B L46、TB-A H43、TB-A H67、TB-A H69/71、TB-A H75/76、TB-AL46、TB-A L65、TB-A L67、TB-A V83F、TB-A V83A、TB-A D66G)。使用 PCR 和目前技术状况克隆程序完成用来自 FW2.3 的人 CDR 环交换 TB-A 的鼠 CDR 环。通过完全的基因合成获得编码 SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29 和 SEQ ID NO :30 中公开的所有 VH TB-A 变体的 cDNA。

[0408] SEQ ID NO :31 至 SEQ ID NO :38 中公开了一些更优选的 TB-A。发现这些抗体特别稳定和可溶,如下面表 I 所示。

[0409] 全部 scFv 片段克隆入表达载体用于在大肠杆菌进行周质生产 (Krebber 等 (1997), J. Immunol. Methods 201 :35-55)。

[0410] 除了如上所述的单链抗体衍生物 (scFvs), 如下产生相应的 Fab 片段。选择的轻链可变域 (VL) 与人 Ig kappa 链恒定区融合, 同时适当的重链可变域 (VH) 与人 IgG 的第一个 (N-末端) 恒定区 (CH1) 融合。通过 PCR 从人脾 cDNA 文库扩增这两个人恒定域, 产生 CK 的序列 SEQ ID NO :14 和 CH1 的 SEQ ID NO :15。

[0411] 实验 2 :人源化 scFv 或 Fab 抗体的表达、生产和稳定性

[0412] 编码 TB-wt、其人源化衍生物或 Fab 片段的质粒导入适当的大肠杆菌菌株 (例如 JM83) 进行周质表达。scFv 变体也以包涵体表达, 例如在 BL21 大肠杆菌菌株中。通过包涵体的再折叠和随后通过例如凝胶过滤纯化获得了功能性单链抗体。

[0413] 在标准实验室培养条件 (dYT 培养基, 在 30°C 诱导大约 3 小时, 以 200pm 振荡) 常规摇瓶下, scFvs 周质表达的表达产量在每升培养物 0.5mg 至 12mg 之间。通常, 我们注意到, 如我们预先对为稳定性和可溶性所选构架区的分析所预期的那样 (Auf der Maur, 等 (2004), Methods 34 :215-224), 人源化衍生物的序列与受体构架区序列 (FW2.3) 越接近, 在细菌中表达获得的产量越高。例如, TB-B 表达获得的产量比 TB-A 表达获得的产量高得多。根据这些发现, 降低 TB-A 中存在的不同氨基酸的数量对表达产量具有积极作用 (图 3A)。

[0414] 本发明抗体或抗体衍生物的另一个重要特征是它们的可溶性。图 3B 显示了构架区 TB-A 就在磷酸盐缓冲盐水中的溶解度而言优于供体构架区 (TB-wt) 的优势。在分析性凝胶过滤中, TB-A 主要以单体状态迁移 (峰值在 70ml), 而 TB-wt 显示出形成聚集体的强烈倾向 (峰值在 50ml)。除了这些, 通过 PEG 沉淀法估计 TB-A 及其某些衍生物的最大可溶性 (Athat DH. 等 JBC. 1981, 256 :23. 12108-12117)。

[0415] 简言之, 在聚乙二醇 3000 (PEG3000) 存在下测定测试蛋白的表观溶解度。通过测定离心的蛋白-PEG300 混合物的上清液中蛋白浓度来测定溶解度曲线。所有曲线显示出  $\log S(\text{mg/ml})$  与 PEG3000 浓度 (% , w/v) 之间的线性相关。线性回归向 0% PEG 的外推法估计测试蛋白的最大溶解度 ( $S_{\text{max}}$ ) (表 I)。对于 TB-A, 计算  $S_{\text{max}}$  是大约 70mg/ml。所有测试蛋白显示出极好的溶解度。在第二个方法中, 应用被称为自身相互作用层析 (SIC) 的方法估计 1mg/ml 浓度的 TB-A (SEQ ID NO :40)、TB-A linker\_G2R\_H\_F68L (SEQ ID NO :33)、TB-A H\_K43R/F68I (SEQ ID NO :34) 和 TB-A H\_F68L (SEQ ID NO :35) 在 PBS (50mM 磷酸盐 pH 6.5, 150mM NaCl) 中的分子间引力 / 排斥力。在这个方法中, 感兴趣蛋白固定在多孔固定相上并

装填入柱。游离（流动相）和固定的蛋白之间的相互作用被检测为保留体积的变动。根据 Tessier, PM 等. *Biophys. J.* 2002, 82:1620-1632 计算蛋白 osmotic second virion 系数  $B_{22}$ , 其是分子间引力 / 排斥力的尺度（表 I）。 $B_{22}$  正数越高, 测试蛋白的分子间引力越低, 因此它的溶解度越高。由于测试蛋白序列的高度相似性, 假定不同蛋白的  $B_{22}$  值可以直接彼此比较。

[0416] 表 I: TB-A 衍生物的溶解度特性

[0417]

序列	pI	Log $S_{max}$	$B_{22}$ 值 (SIC)
TB-A	7.8	1.81 ± 0.13	-24.5 × 10 <sup>-4</sup> ± 3.8 × 10 <sup>-4</sup>
TB-A H_M48L/F68I	7.8	nd	nd
TB-A L_V83E H_V79A	6.58	nd	nd
TB-A Linker_G2R H_F68L	8.2	1.91 ± 0.09	1.59 × 10 <sup>-3</sup> ± 5.9 × 10 <sup>-5</sup>
TB-A H_K43R/F68I	7.8	1.86 ± 0.02	1.28 × 10 <sup>-3</sup> ± 3.0 × 10 <sup>-4</sup>
TB-A H_F68L	7.8	1.88 ± 0.07	1.06 × 10 <sup>-4</sup> ± 2.9 × 10 <sup>-5</sup>
TB-A H_F68A	7.8	nd	nd
TB-A H_F68V/F70L	7.8	nd	nd
TB-A H_F70L	7.8	nd	nd

[0418] 本发明抗体或抗体衍生物的另一个相关特征是它们的高稳定性。通过经圆二色光谱和光散射在 218 和 292nm 测定伸展开始的温度, 评价 TB-A、TB-A H\_M48L/F68I (SEQ ID NO:31)、TB-A Linker\_G2R H\_F68L (SEQ ID NO:33)、TB-A H\_K43R/F68I (SEQ ID NO:34) 和 TB-A H\_F68L (SEQ ID NO:35) 的蛋白稳定性（表 II）。在这个实验中, TB-A 在 53°C 的温度开始伸展, 而它的衍生物 TB-A H\_M48L/F68I (SEQ ID NO:31)、TB-A Linker\_G2R H\_F68L (SEQ ID NO:33)、TB-A H\_K43R/F68I (SEQ ID NO:34) 和 TB-A H\_F68L (SEQ ID NO:35) 显示出热稳定性增加 (56°C 和 58°C)。所有的测试蛋白在伸展时显示出不可逆变性作用和沉淀, 使得不可能测定溶解温度。为了测定可逆过程中转变 (transition) 中点, 用盐酸胍 (GdnHCl) 诱导伸展以保持伸展蛋白在溶解状态。在这个方法中, 荧光发射最大通过荧光测定法测定, 以跟踪伸展。在这个设置中, TB-A 再次显示出好的稳定性, 转变中点在 2.07M GdnHCl。与热力伸展引起的结果一致, 衍生物 TB-A Linker\_G2R H\_F68L (SEQ ID NO:33) 和 TB-A H\_K43R/F68I (SEQ ID NO:34) 显示出稳定性增加, 因为显示出较高的转变中点, 分别是 2.33 和 2.3M GdnHCl。

[0419] 表 II: TB-A 衍生物的稳定性特性

[0420]

序列	变性开始 [°C]	转变中点时的 [GdnHCl]
TB-A	53	2.07M
TB-A H_M48L/F68I	58	nd
TB-A L_V83E H_V79A	nd	nd
TB-A Linker_G2R H_F68L	58	2.33M
TB-A-QC15.2	56	2.30M
TB-A-QC23.2	58	nd
TB-A H_F68A	nd	nd
TB-A H_F68V/F70L	nd	nd
TB-A H_F70L	nd	nd

[0421] 通过在各个体液或作为阳性对照的试验缓冲液 (TBSTM) 中 37°C 孵育 3 天后测定 TB-A 的 TNF  $\alpha$  结合活性, 检测 TB-A 在人血清、人尿液、猪玻璃体液和猪前房液中的稳定性。TB-A 在体液中稀释为 10  $\mu$ M 的终浓度。孵育期后, 为了测定 TB-A 的结合常数  $K_d$ , 用 ELISA

检测系列稀释样品（图 11）。当体液样品与阳性对照 TBSTM 样品比较时， $K_d$ 向更高浓度变化表明孵育期间活性蛋白减少。然而，在我们的实验中，没有检测到这样的变化，表明由于抗体的高稳定性，完全活性的 TB-A 量在每种体液试验中保持恒定。

[0422] 实验 3：人源化抗体衍生物的结合特性

[0423] 在 ELISA 中，测试所有人源化 scFv 变体与重组人 TNF  $\alpha$  的结合性能。所有变体的解离常数 ( $K_d$ ) 位于 0.8 至 10' 000nM 以上的范围内。似乎在与人受体构架区的同源性等级和各个结合物的亲和力之间存在反向相关性（图 4A）。然而，含有朝向 TB-B 序列突变的一些 TB-A 变体显示出与 TB-A 相当的与人 TNF  $\alpha$  的亲和性水平。图 4B 显示了在 ELISA 中比较时显示出与 TB-A 相似亲和力的两个表达产量提高的 TB-A 衍生物（比较图 3A）。

[0424] TB-A 代表表达产量和亲和力明显权衡之间好的折衷。在亲和力方面，单链和 Fab 片段形式的 TB-A 之间没有检测到显著的差异（数据未显示）。

[0425] 通过表面等离子共振 (BIAcore) 也测定了 TB-A 对 TNF  $\alpha$  的亲和力和结合动力学，得到解离常数  $K_d = 0.8\text{nM}$ ,  $k_{\text{off}}$  解离速率 =  $4.4 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$  和  $k_{\text{on}}$  结合速率 =  $5 \times 10^5\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ 。

[0426] 实验 4：L929 细胞毒性试验

[0427] 抗体或抗体衍生物在体内中和 TNF  $\alpha$  的作用可通过测定抑制 TNF  $\alpha$  对培养的小鼠 L929 成纤维细胞或作为替代方案对人 KYM-1 骨髓肉瘤细胞的细胞毒性来检测（表 III）。Di62 的人源化 scFv 衍生物在 L929 试验中显示出不同的功效，如图 5B 所示。一些 scFv 衍生物显示出 5ng/ml 范围内的 IC<sub>50</sub>（达到 50% 抑制的抑制浓度）值，而其他的在 L929 试验中没有效果。ELISA 数据和 L929 试验的结果并不总是相关。然而，KYM-1 数据和 L929 结果极好地相关，唯一的不同是重组人 TNF 的浓度高很多和因此看到作用所需的拮抗剂浓度也高很多。因此 KYM-1 主要用于证实 L929 结果。为了测试蛋白的直接比较，用对 TB-A 标准化的相对值 ( $\text{EC}_{50}\text{X}/\text{EC}_{50}\text{TB-A}$ ) 表示效能。然而结合者的序列与人受体构架区 (FW2.3) 越接近，通常 IC<sub>50</sub> 值再次变得更高。图 5 比较了 TB-A 不同衍生物阻断 TNF  $\alpha$  诱导的对小鼠 L929 成纤维细胞的细胞毒性的效力。在 450nm 的吸光度与细胞存活率相关。

[0428] TB-A 和抗 hTNF  $\alpha$  IgG Infliximab<sup>®</sup>（英夫利昔单抗）在 L929 试验中显示出相似的 IC<sub>50</sub> 值，而 TB-wt 阻断人 TNF  $\alpha$  诱导细胞毒性的效力显著较低（图 5A）。当 TB-A 衍生物与 TB-A 比较它们阻断 TNF  $\alpha$  诱导的细胞毒性的效力时，这些衍生物中大多数在 L929 中都具有降低的功效，除了 TB-H43（图 5B）。

[0429] 表 III：TB-A 衍生物的功能特性

[0430]

序列	相对效力： $\text{EC}_{50}\text{X}/\text{EC}_{50}\text{TB-A}$	
L929 细胞	KYM-1 细胞	
TB-A	1.0	1.0
TB-A H_M48L/F68I	1.1	1.6
TB-A L_V83E H_V79A	nd	nd
TB-A Linker_G2R H_F68L	0.8	1.3
TB-A-QC15.2	1.37	1.5
TB-A-QC23.2	1.32	1.5
TB-A H_F68A	1.14	nd
TB-A H_F68V/F70L	1.28	nd
TB-A H_F70L	2.7	nd

[0431] 与 ELISA 数据一致，scFv 和 Fab 形式的 TB-A 之间在阻断 TNF  $\alpha$  诱导的细胞毒性的能力上没有显著差异（图 5C）。TB-A Fab 形式的 IC<sub>50</sub> 值是 TB-A scFv 形式 IC<sub>50</sub> 值的大约 2 倍（图 5C），最可能是 Fab 片段分子量更高的结果。

[0432] 实验 5. 用抗 TNF  $\alpha$  抗体衍生物进行动物实验

[0433] 5. 1. 实验说明

[0434] 为了测试 ESBATech' s 抗 TNF  $\alpha$  抗体衍生物 (scFv 和 Fab) 在体内情况下功能性和人 TNF  $\alpha$  生物活性的功效, 使用最近公开的大鼠急性单关节炎模型。Bolon 和同事们已经广泛描述了这个模型 (参见 Bolon 等 (2004), Vet. Pathol. 41 :235-243)。简言之, 在这个动物关节炎模型中, 人 TNF  $\alpha$  通过关节内注入雄性 Lewis 大鼠膝关节。人 TNF  $\alpha$  的注射引起被注射关节的急性、自限性单关节炎。关节炎可以根据关节肿胀和组织学得分的测定结果来定量。因此, 各个 TNF  $\alpha$  拮抗剂的生物活性可以通过 TNF  $\alpha$  诱导的关节肿胀的降低和 / 或炎症的组织学参数的降低来定量。

[0435] 5. 2. 材料和方法

[0436] 实验设计

[0437] 当前的研究被设计用于研究如上所述抗体系列中的代表性 scFv 抗体和代表性 Fab 抗体与市售抗体英夫利昔单抗 (Remicade<sup>®</sup>) 抑制适当的动物关节炎模型中人 TNF  $\alpha$  生物活性的各自潜力。Bolon 和同事们已经表明 10 微克重组人 TNF  $\alpha$  通过关节内应用于大鼠膝关节激起可通过标准宏观和微观分析定量的急性、自限性单关节炎。因此这个动物模型充当估计局部应用抗体衍生物的治疗作用的理想系统。系列完成了两个实验 (表 IV 和 V), 1) 估计抗体阻断人 TNF  $\alpha$  诱导的单关节炎的总体潜力的基本功效研究; 和 2) 估计抗体衍生物彼此之间相对功效的剂量反应研究。细胞因子和抗体衍生物都是通过分开注射给予一次, 如下所述。使用的细胞因子剂量基于 Bolon 和同事们的出版物, 而抗体衍生物的剂量范围基于可利用的细胞培养数据和有根据的推测。根据一般的动物管理准则实施实验。

[0438] 动物和饲养

[0439] 将年轻的、成年雄性 Lewis 大鼠 (6-7 周和 175-200g) 随机分配至处理组 ( $n = 3$ /组) 并根据 Bolon 等 (2004), Vet. Pathol. 41 :235-243 关养。

[0440] 细胞因子和抗体滴注

[0441] 如 Bolon 和同事们的描述实行麻醉和细胞因子注射。为了不超过 50 微升的关节内注射总体积, 细胞因子和抗体衍生物以两个分开的关节内注射滴入, 借此 10 微克重组人 TNF  $\alpha$  在 10 微升过滤除菌的磷酸缓冲盐水 (PBS) 中注射而各个抗体的各自剂量在 40 微升过滤除菌的磷酸缓冲盐水中注射。腹膜内应用英夫利昔单抗 /Remicade<sup>®</sup> 处理的动物在关节内注射人 TNF  $\alpha$  前 3 小时通过腹膜内注射抗体衍生物。在关节内应用抗体治疗处理的所有动物中, 注射人 TNF  $\alpha$  前 5 分钟注射各个抗体剂量。对照动物注射无人 TNF  $\alpha$  的 10 微升 PBS。

[0442] 实验中使用的英夫利昔单抗 /Remicade<sup>®</sup> 购自瑞士官方药房。在大肠杆菌中表达抗人 TNF  $\alpha$  特异性 scFv 和 Fab (TB-A) 抗体以及在剂量反应实验中用作非特异性对照抗体的天然 scFv 抗体构架区并用标准方法纯化。所有制剂中内毒素污染低于每毫克蛋白 10EU, 因为脂多糖成分是有力的 TNF  $\alpha$  诱导剂。

[0443] 重组人 TNF  $\alpha$  购自 PeptoTech EC Ltd。

[0444] 关节直径的测定

[0445] 在注射分别通过腹膜内或关节内应用的抗体衍生物之前或在对照动物的情况下,

在注射 PBS 或 TNF  $\alpha$  之前即刻用标准测径器测定被注射的膝关节直径。注射 TNF  $\alpha$  (或在对照动物是 PBS) 后 48 小时和杀死动物之前即刻再次测定注射膝关节的直径并用第一个直径测定值减去第二个直径测定值来计算关节肿胀 (图 6 和 9)。

[0446] 组织处理

[0447] 注射 TNF  $\alpha$  (或在对照动物的情况下是 PBS) 48 小时后, 杀死动物。尸体解剖时, 将注射的膝盖与足和股分开, 浸入 70% 乙醇中固定完好并进行标准的苏木精和伊红 (HE) 染色, 如 Bolon 和同事们的所述。

[0448] 形态学分析

[0449] 如 Bolon 和同事们的描述进行测定关节炎的组织学评分分析。应用根据 Bolon 和同事们的评定关节炎的组织病理学评分标准 (图 7、8 和 10)。

[0450] 5.3. 结果

[0451] 在第一组实验中, 根据下表 IV, 将代表性的关节内应用的 ESBATech scFv 抗体, TB-A, 和相应的关节内应用的 ESBATech Fab 抗体阻断诱导急性单关节炎的能力和关节内和腹膜内应用的英夫利昔单抗 /Remicade<sup>®</sup> 进行比较:

[0452] 表 IV: 注射方案 实验 1

[0453]

组	PBS 中的 TNF $\alpha$ ( $\mu$ g)	抑制剂	剂量 ( $\mu$ g)
1 (n = 3)	0	无	
2 (n = 3)	10	无	
3 (n = 3)	0	TB-A scFv	180
4 (n = 3)	10	TB-A scFv	180
5 (n = 3)	0	TB-A Fab 抗体	450
6 (n = 3)	10	TB-A Fab 抗体	450
7 (n = 3)	10	TB-A Fab 抗体	180
8 (n = 3)	0	英夫利昔单抗 (关节内)	450
9 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (关节内)	450
10 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (关节内)	180
11 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (腹膜内)	450
12 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (腹膜内)	180

[0454] 图 6 呈现了获得的关于处理对膝直径改变的影响（作为对 TNF  $\alpha$  诱导的关节肿胀的影响的指示）的结果。所有抗体完全阻断了 TNF  $\alpha$  诱导的关节肿胀。

[0455] 为评价关节炎症的治疗效果,实行 HE 染色组织玻片的组织学评分。通过下列标准为关节炎症打分（参见图 7 中代表性评分实例）：

[0456] 得分 0 :正常

[0457] 得分 1 :滑膜衬里层轻微增厚

[0458] 得分 2 :滑膜衬里层增厚和衬里下层轻微炎症

[0459] 得分 3 :滑膜衬里层增厚和衬里下层中等炎症

[0460] 图 8 显示了获得的关于对组织病理炎症得分的治疗效果的结果。

[0461] 观察到所有治疗对组织病理炎症得分具有相类似的效果。

[0462] 在第二组实验中,比较了对评价的抗体衍生物的相对剂量反应。根据表 V,将实验 1 的代表性的关节内应用的 ESBATech scFv 抗体 TB-A 和相应的关节内应用的 Fab 抗体与关节内和腹膜内应用的英夫利昔单抗 /Remicade<sup>®</sup> 和缺乏任何与人 TNF  $\alpha$  的结合活性的无关 scFv 抗体在比 实验 1 更宽和不同的剂量范围内相比。

[0463] 表 V :注射方案实验 2

[0464]

组	PBS 中的 TNF $\alpha$ ( $\mu$ g)	抑制剂	剂量 ( $\mu$ g)
1 (n = 3)	0	无	
2 (n = 3)	10	无	
3 (n = 3)	10	无关 scFv 抗体	180
4 (n = 3)	10	TB-A scFv 抗体	156
5 (n = 3)	10	TB-A scFv 抗体	45
6 (n = 3)	10	TB-A scFv 抗体	11
7 (n = 3)	10	TB-A Fab 抗体	156
8 (n = 3)	10	TB-A Fab 抗体	45
9 (n = 3)	10	TB-A Fab 抗体	11
10 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (关节内)	156
11 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (关节内)	45
12 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (关节内)	11
13 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (腹膜内)	156
14 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (腹膜内)	45
15 (n = 3)	10	英夫利昔单抗 (腹膜内)	11

[0465] 图 9 显示了获得的关于处理对膝直径改变的影响（作为对 TNF  $\alpha$  诱导的关节肿胀的影响的指示）的结果。

[0466] 图 10 提供了获得的关于对组织病理炎症得分的治疗效果的结果。

[0467] 总之,代表性的 ESBATech 抗 TNF  $\alpha$  scFv 和代表性的 ESBATech 抗 TNF  $\alpha$  Fab 抗体二者在局部（关节内）给药后阻断人 TNF  $\alpha$  诱导的单关节炎方面都非常有效。

[0468] 尽管显示和描述了目前本发明优选的实施方案,但是会清楚地理解本发明不限于它们,而是可以在下列权利要求范围内另外进行各种实施和实践。

## 序列表

<110>ESBATech AG

<120> 抑制 TNFalpha 的稳定和可溶的抗体

<130>12013PC

<160>40

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>108

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-B 的衍生物

<220>

<221>VL/TB-A

<222>(1).. (108)

<400>1

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
           20           25           30
Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg

```

100

105

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;117

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;TB-B 的衍生物

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;VH/TB-A

&lt;222&gt;(1).. (117)

&lt;400&gt;2

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr
			20					25						30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Phe
		50				55					60				
Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90				95	
Ala	Arg	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115											

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;108

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人 - 鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;VL/TB-B

<222>(1).. (108)

<400>3

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp
			20					25						30	
Val	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40						45		
Tyr	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Arg
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Val	Lys	Arg				
			100						105						

<210>4

<211>117

<212>PRT

<213> 人 - 鼠

<220>

<221>VH/TB-B

<222>(1).. (117)

<400>4

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	His	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40						45		
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Gly	Thr	Val	Tyr

65	70	75	80
Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser			
	115		

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;108

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;VL/FW2.3

&lt;222&gt;(1)..(108)

&lt;400&gt;5

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Glu			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Pro Tyr			
	85	90	95
Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg			
	100	105	

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;124

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人

<220>

<221>VH/FW2.3

<222>(1)..(124)

<400>6

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25					30		
Phe	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Asn	Pro	Asp	Ser	Gly	Asp	Thr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Gly	Thr	Val	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Val	Pro	Arg	Gly	Thr	Tyr	Leu	Asp	Pro	Trp	Asp	Tyr	Phe	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

<210>7

<211>108

<212>PRT

<213>人工

<220>

<223>TB-A 的衍生物

<220>

<221>VL/TB\_L2

<222>(1)..(108)

<400>7

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
                   20                  25                  30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                  40                  45  
 Tyr Ala Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                  55                  60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                  70                  75                  80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg  
                   85                  90                  95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg  
                   100                  105

<210>8

<211>108

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 从 TB-A 衍生而来

<220>

<221>VL/TB\_L3

<222>(1).. (108)

<400>8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                  5                  10                  15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
                   20                  25                  30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                  40                  45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                  55                  60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                  70                  75                  80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Pro Tyr  
                   85                  90                  95

Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg  
 100 105

<210>9

<211>117

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-A 的衍生物

<220>

<221>VH/TB\_H2

<222>(1).. (117)

<400>9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asn Pro Asp Ser Gly Asp Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Asp Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210>10

<211>20

<212>PRT

<213> 人工接头

<220>

<223> 人工接头序列

<220>

<221> 甘氨酸 - 丝氨酸接头

<222>(1).. (20)

<400>10

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	
Gly	Gly	Gly	Ser												
			20												

<210>11

<211>108

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-B 的衍生物

<220>

<221>VL/TB-B R46L

<222>(1).. (108)

<400>11

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5						10				15	
Asp	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp
			20					25					30		
Val	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Arg
				85						90				95	

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg  
 100 105

<210>12

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>scFV, 人 - 鼠, 带有人工接头

<220>

<221>TB-AB

<222>(1).. (245)

<223>VL (TB-A)- 接头 -VH(TB-B)

<400>12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 130 135 140  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr His Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
 180 185 190  
 Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Gly Thr Val Tyr  
 195 200 205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210>13

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>scFv, 人 - 鼠, 带有人工接头

<220>

<221>TB-BA

<222>(1).. (245)

<223>VL(TB-B) - 接头 - VH(TB-A)

<400>13

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly

	100		105		110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser					
	115		120		125
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
	130		135		140
Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr					
145		150		155	160
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met					
	165		170		175
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe					
	180		185		190
Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr					
	195		200		205
Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	210		215		220
Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu					
225		230		235	240
Val Thr Val Ser Ser					
	245				

&lt;210&gt;14

&lt;211&gt;106

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;人 Ig 的 C-kappa

&lt;222&gt;(1).. (105)

&lt;400&gt;14

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln					
1		5		10	15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr					
	20		25		30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser					
	35		40		45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr					
	50		55		60



<222>(1).. (108)

<400>16

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Gly
1			5					10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp
			20					25					30		
Val	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Met	Leu	Met
			35				40					45			
Tyr	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
			50			55					60				
Arg	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala
65					70					75				80	
Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Arg
					85				90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
					100				105						

<210>17

<211>117

<212>PRT

<213> 鼠

<220>

<221>VH/TBwt

<222>(1).. (117)

<400>17

Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr
				20					25					30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
				35			40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe
				50			55				60				
Lys	Glu	His	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Val	Phe
65					70					75				80	







Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
                   20                   25                   30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                   40                   45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                   55                   60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg  
                   85                   90                   95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly  
                   100                   105                   110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                   115                   120                   125  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
                   130                   135                   140  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                   165                   170                   175  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
                   180                   185                   190  
 Lys Asp Arg Phe Thr Leu Ser Arg Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
                   195                   200                   205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   210                   215                   220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225                   230                   235                   240  
 Val Thr Val Ser Ser  
                   245

<210>21

<211>245

<212>PRT

<213>人工

<220>

<223>scFv, 人 - 鼠, 带有人工接头

<220>

<221>TB-A H76/77

<222>(1).. (245)

<223>scFv VL (TB-A)- 接头 -VH (TB-A A76I/S77G)

<400>21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
                   20                    25                    30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly  
                   100                    105                    110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                   115                    120                    125  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Sar Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
                   130                    135                    140  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
 145                    150                    155                    160  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                   165                    170                    175  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
                   180                    185                    190  
 Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ile Gly Thr Val Tyr  
                   195                    200                    205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   210                    215                    220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225                    230                    235                    240

Val Thr Val Ser Ser  
245

<210>22

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>scFv, 人 - 鼠, 带有人工接头

<220>

<221>TB-A L46

<222>(1).. (245)

<223>scFv VL (TB-A L46R)- 接头 -VH(TB-A)

<400>22

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp
				20				25						30	
Val	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
				35				40						45	
Tyr	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
				50				55						60	
Arg	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Arg
					85					90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Val	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly
					100					105				110	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
					115					120				125	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
														130	
														135	
														140	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr
145														150	
														155	
														160	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met



Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 130 135 140  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 165 170 175  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
 180 185 190  
 Lys ASp Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 195 200 205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210>24

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>scFv, 人 - 鼠, 带有人工接头

<220>

<221>TB-A L67

<222>(1).. (245)

<223>scFv VL(TB-A Y67S)- 接头 -VH(TB-A)

<400>24

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp



<222>(1).. (117)

<400>25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
                   20                   25                   30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                   40                   45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
                   100                   105                   110  
 Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210>26

<211>108

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 从 TB-A 衍生而来

<220>

<221>VL/TB-A V83F

<222>(1).. (108)

<400>26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
                   20                   25                   30



<210>28

<211>117

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 从 TB-A 衍生而来

<220>

<221>VH/TB-AH43/70/71/73/77

<222>(1).. (117)

<223>TB-A 的 VH, 具有 K43Q/F70L/S71T/E73D/S77G

<220>

<221>VH/TB-A H43/70/71/73/77

<222>(1).. (117)

<223>TB-A 的 VH, 具有 K43Q/F70L/S71T/E73D/S77G

<400>28

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr
			20					25						30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40						45		
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Phe
			50				55					60			
Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ser	Ala	Gly	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95
Ala	Arg	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
					100				105						110
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
					115										

<210>29



<220>

<221>VH/TB-A H11/16/43/66/70/73/77/93/112

<222>(1).. (117)

<223>TB-A 的 VH, 具有 V11D/A16GK43Q/D66G/F70L/S71T/E73D/S77G/V93T/L112S

<220>

<221>VH/TB-A H11/16/43/66/70/73/77/93/112

<222>(1).. (117)

<223>TB-A 的 VH, 具有 V11D/A16G/K43Q/D66G/F70L/S71T/E73D/S77G/V93T/L112S

<400>30

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Asp	Lys	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr
			20					25						30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40						45		
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ser	Ala	Gly	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser
				100				105						110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115											

<210>31

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-A 的衍生物

<220>

<221>TB-A H\_M48L/F68I

<222>(1).. (245)

<223>TB-A,带有通过 SEQ ID NO :10 连接的 TB-A 的 VL 及 VH M48L 和 F68I

<400>31

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
                   20                   25                   30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                   40                   45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                   55                   60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg  
                   85                   90                   95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly  
                   100                   105                   110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                   115                   120                   125  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
                   130                   135                   140  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
                   165                   170                   175  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
                   180                   185                   190  
 Lys Asp Arg Ile Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
                   195                   200                   205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   210                   215                   220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225                   230                   235                   240  
 Val Thr Val Ser Ser  
                   245

<210>32

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-A 的衍生物

<220>

<221>TB-A L\_V83E H\_V79A

<222>(1).. (245)

<223> 带有通过 SEQ ID No :10 连接的 VL V83E 和 VH\_V79A 的 TB-A

<400>32

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
           20           25           30
Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly
           100          105          110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
           115          120          125
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
           130          135          140
Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
145          150          155          160
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
           165          170          175
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe
           180          185          190
Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

```



Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 130 135 140  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 165 170 175  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
 180 185 190  
 Lys Asp Arg Leu Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 195 200 205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210>34

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-A 的衍生物

<220>

<221>TB-A H\_k43R/F68I

<222>(1)..(245)

<223>TB-A,带有通过 SEQ ID NO :10 连接的 TB-A 的 VL 和 VH\_K43R\_F68I

<400>34

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly



&lt;400&gt;35

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
                   20                   25                   30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                   40                   45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                   55                   60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg  
                   85                   90                   95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly  
                   100                   105                   110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                   115                   120                   125  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
                   130                   135                   140  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                   165                   170                   175  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
                   180                   185                   190  
 Lys Asp Arg Leu Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
                   195                   200                   205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   210                   215                   220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225                   230                   235                   240  
 Val Thr Val Ser Ser  
                   245

&lt;210&gt;36

&lt;211&gt;245

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工

<220>

<223>TB-A 的衍生物

<220>

<221>TB-A H\_F68A

<222>(1)..(245)

<223>TB-A,带有通过 SEQ ID NO :10 连接的 TB-A 的 VL 和 VH\_F68A

<400>36

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
           20           25           30
Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly
           100          105          110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
           115          120          125
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
           130          135          140
Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
145          150          155          160
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
           165          170          175
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe
           180          185          190
Lys Asp Arg Ala Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
           195          200          205
Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           210          215          220
Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

```



Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 165 170 175  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe  
 180 185 190  
 Lys Asp Arg Val Thr Leu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 195 200 205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210>38

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-A 的衍生物

<220>

<221>TB-A H\_F70L

<222>(1).. (245)

<223>TB-A,带有通过 SEQ ID NO :10 连接的 TB-A 的 VL 和 VH\_F70L

<400>38

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Sar Pro Arg



<210>40

<211>245

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223>TB-A scFv 抗体

<220>

<221>TB-A

<222>(1).. (245)

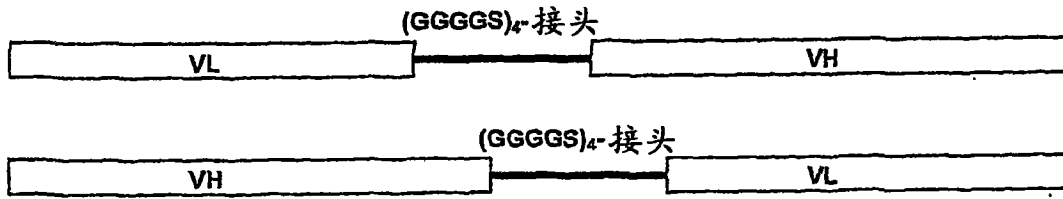
<223>ESBA105

<400>40

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp	20	25	30	
Val	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Ser	Ala	Phe	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Arg	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Arg	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Val	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	100	105	110	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	115	120	125	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	130	135	140	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr	145	150	155	160
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	165	170	175	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Phe	180	185	190	

Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 195 200 205  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Val Thr Val Ser Ser  
 245

ScFv 抗体



VL

TB-A	DIVMTQSPSS	LSASVGDRVT	LTC	[REDACTED]	[REDACTED]WYQORP	GKAPKLLI
TB-B	DIVLTQSPSS	LSASVGDRVT	LTC	[REDACTED]	[REDACTED]WYQORP	GKAPKRLI
	*		R	GIR	ELA	* A

TB-A	[REDACTED]GVPS	RFSGRGYGTD	FLLTISSLQP	EDVAVIYC	[REDACTED]IFGQ
TB-B	[REDACTED]GVPS	RFSGSGSGTE	FLLTISSLQP	EDVAVIYC	[REDACTED]IFGQ
	GSILQS	* * *		*	Y SL YM

TB-A	GTKLEVKR
TB-B	GTKLEVKR

VH

TB-A	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCTASGYTFT	[REDACTED]MHWVRQA	PGKGLEWMG
TB-B	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCTASGYSFT	[REDACTED]MHWVRQA	PGQGLEWMG
		* *	*	G FLH	* * R

TB-A	[REDACTED]DREF	SLETSASTVY	MELTSLSLTSDD	TAVYYCARE
TB-B	[REDACTED]DREF	TRDTSIGTVY	MELTSLSLTSDD	TAVYYCARE
	PDS DTI	Q QG * * * * *		* VP

TB-A	[REDACTED]DA	MHWGQG	TLVTVSS
TB-B	[REDACTED]DA	MHWGQG	TLVTVSS
	TYLDPW Y F		*

图 1

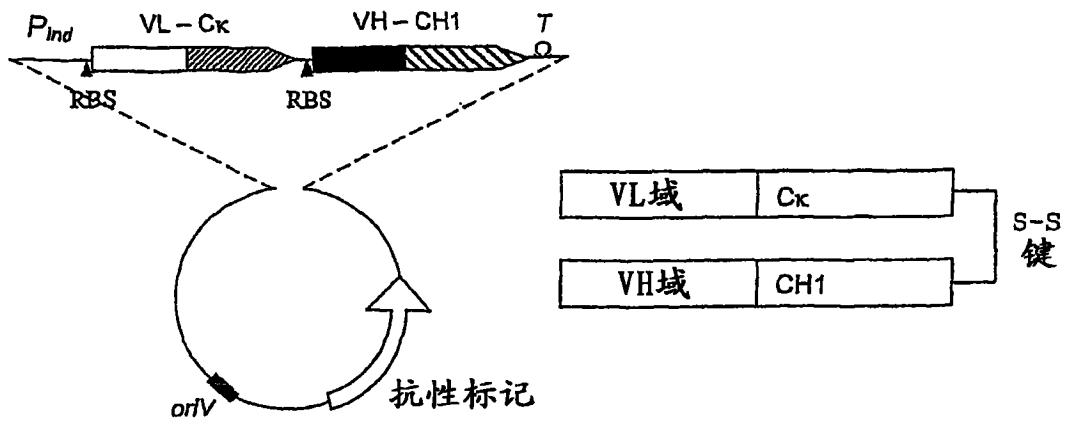
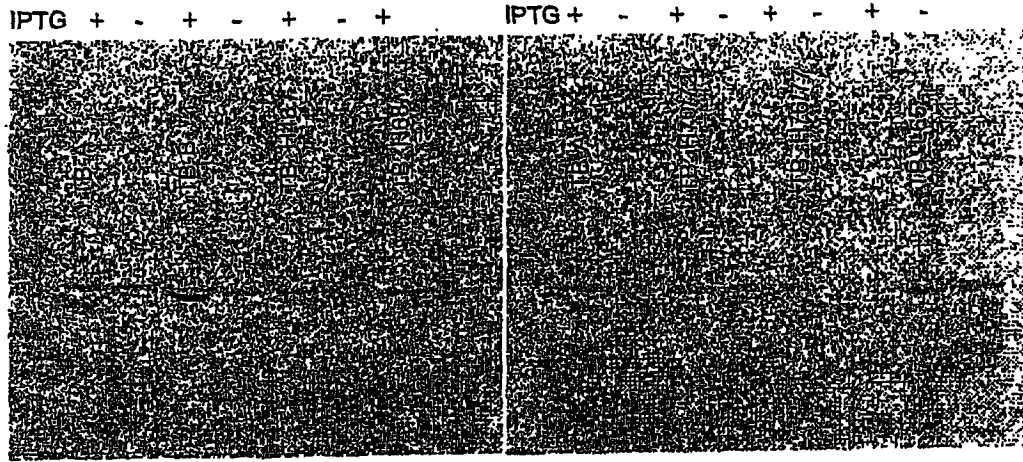


图2

scFv在大肠杆菌中表达的产量

A.



B.

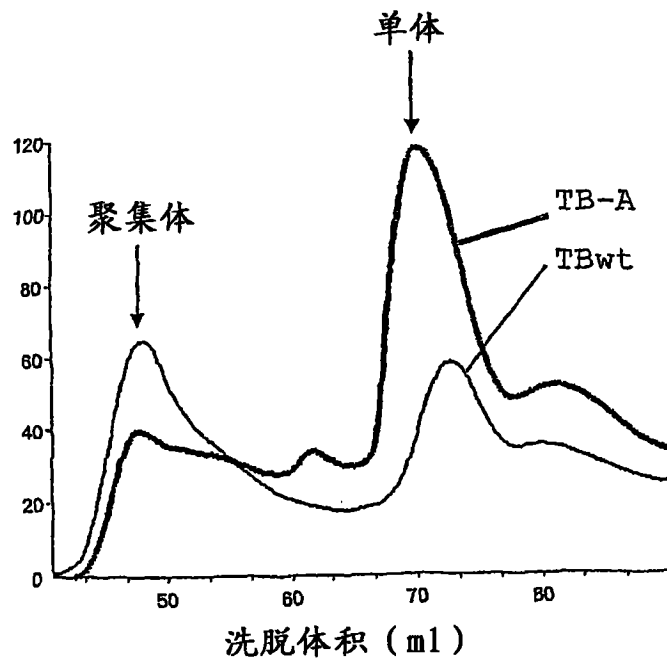
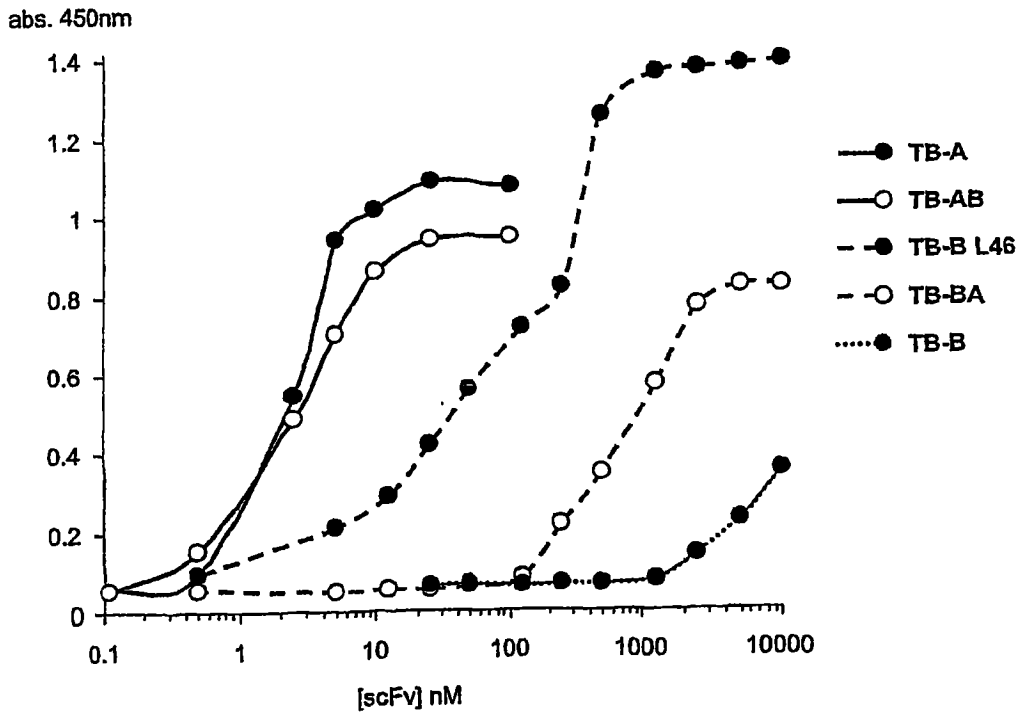


图3

用ELISA进行的亲和力比较

A.



B.

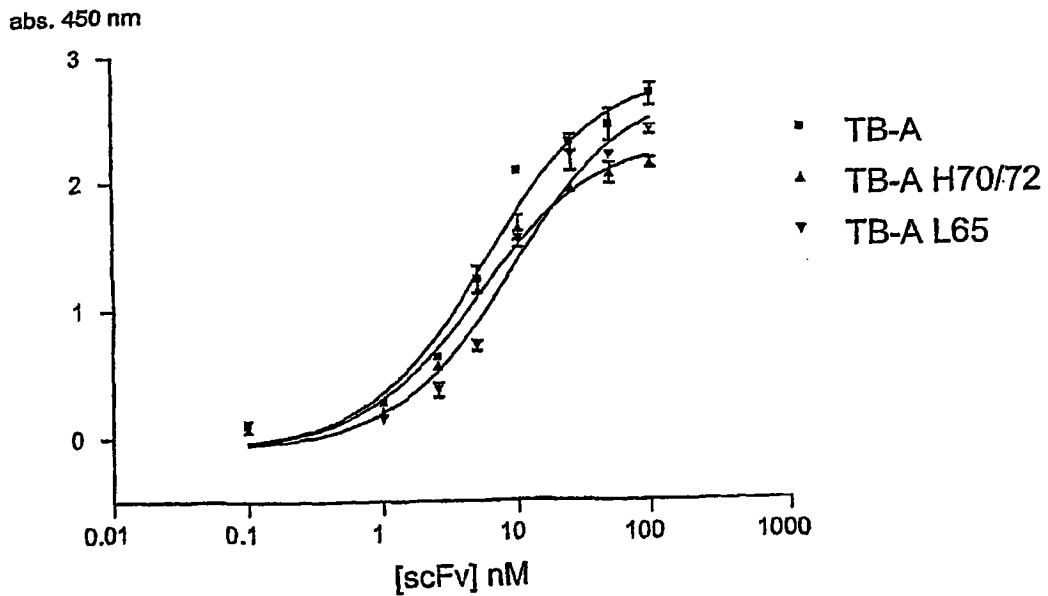
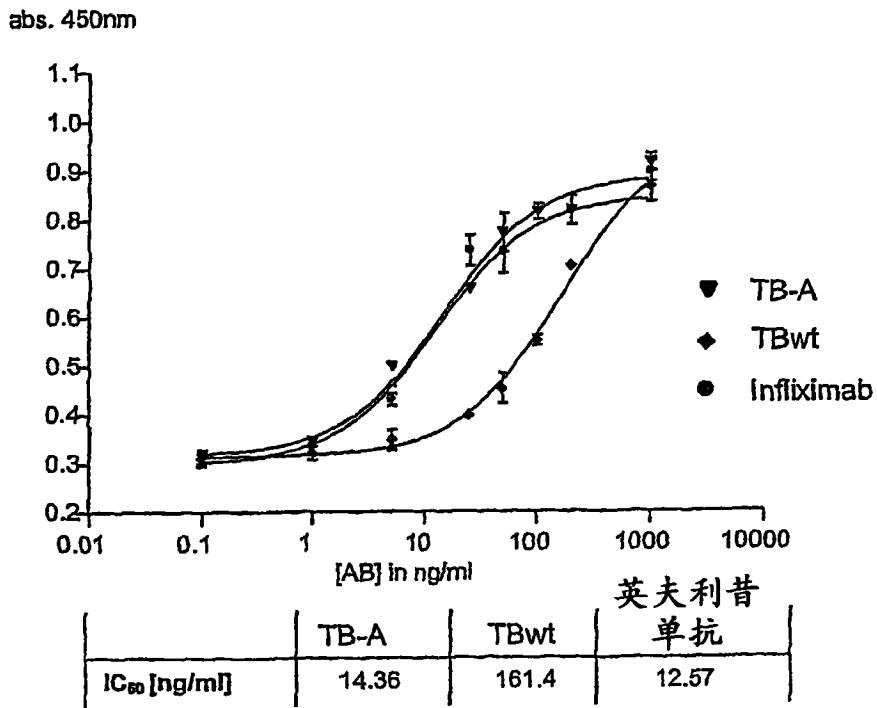


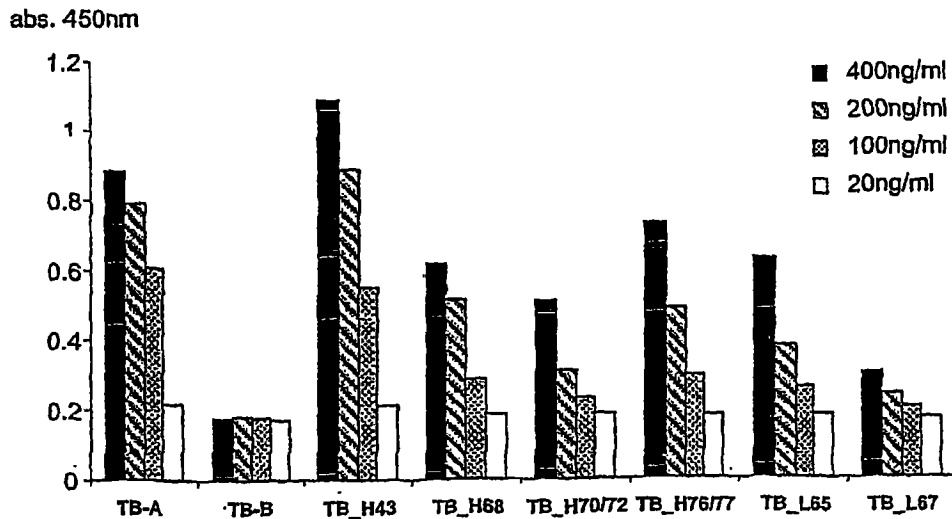
图 4

L929细胞中TNF诱导的细胞毒性的抑制

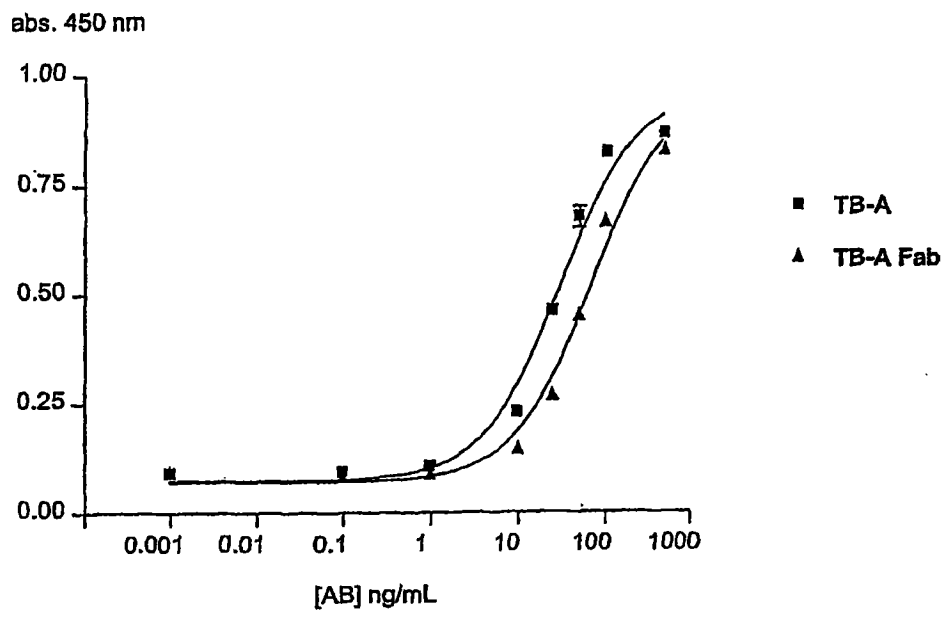
A.



B.



C.



	TB-A	TB-A Fab
IC <sub>50</sub> [ng/ml]	29.7	65.9

图 5

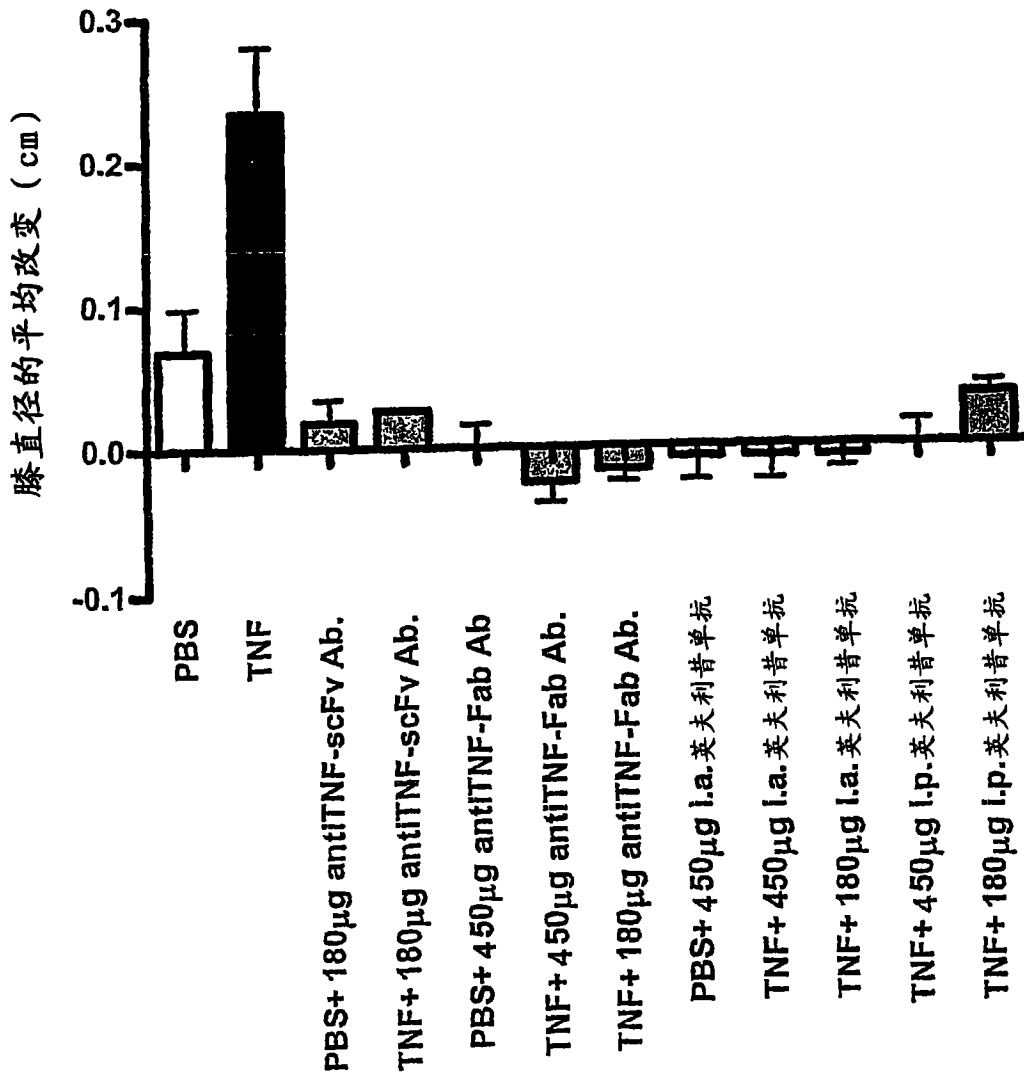


图6

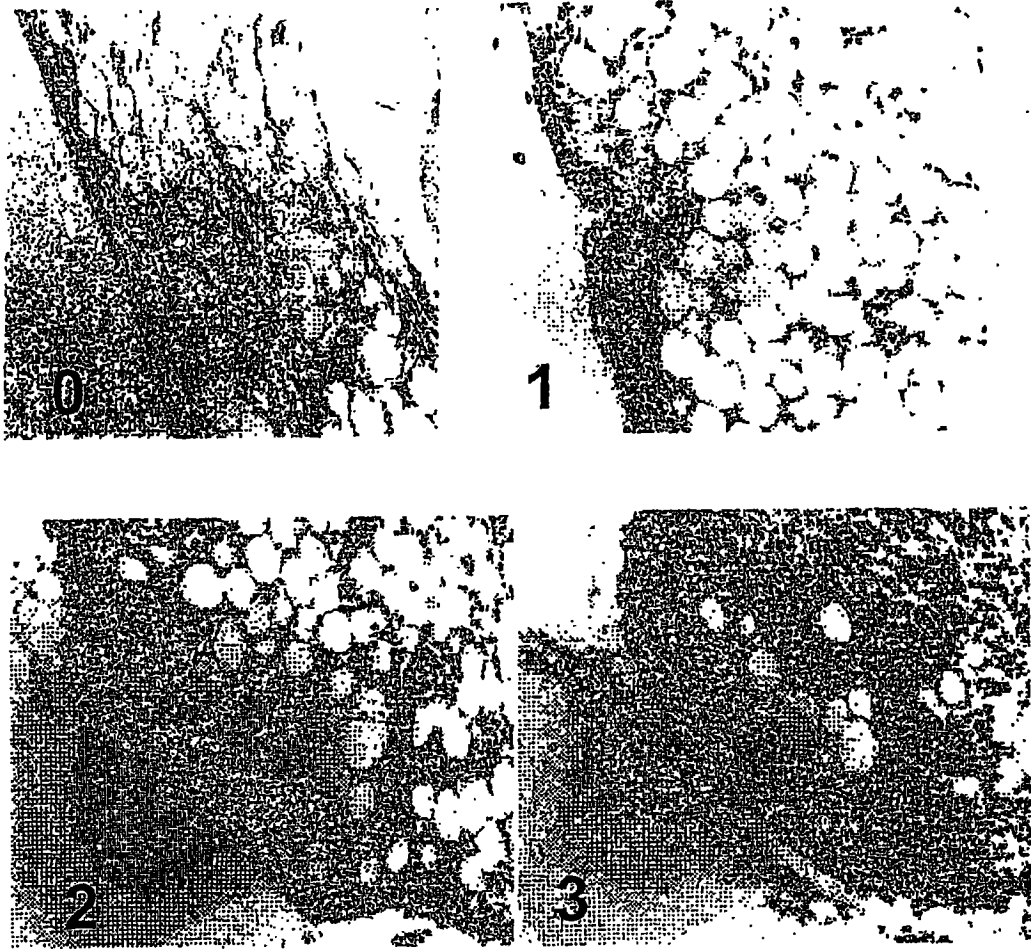


图7

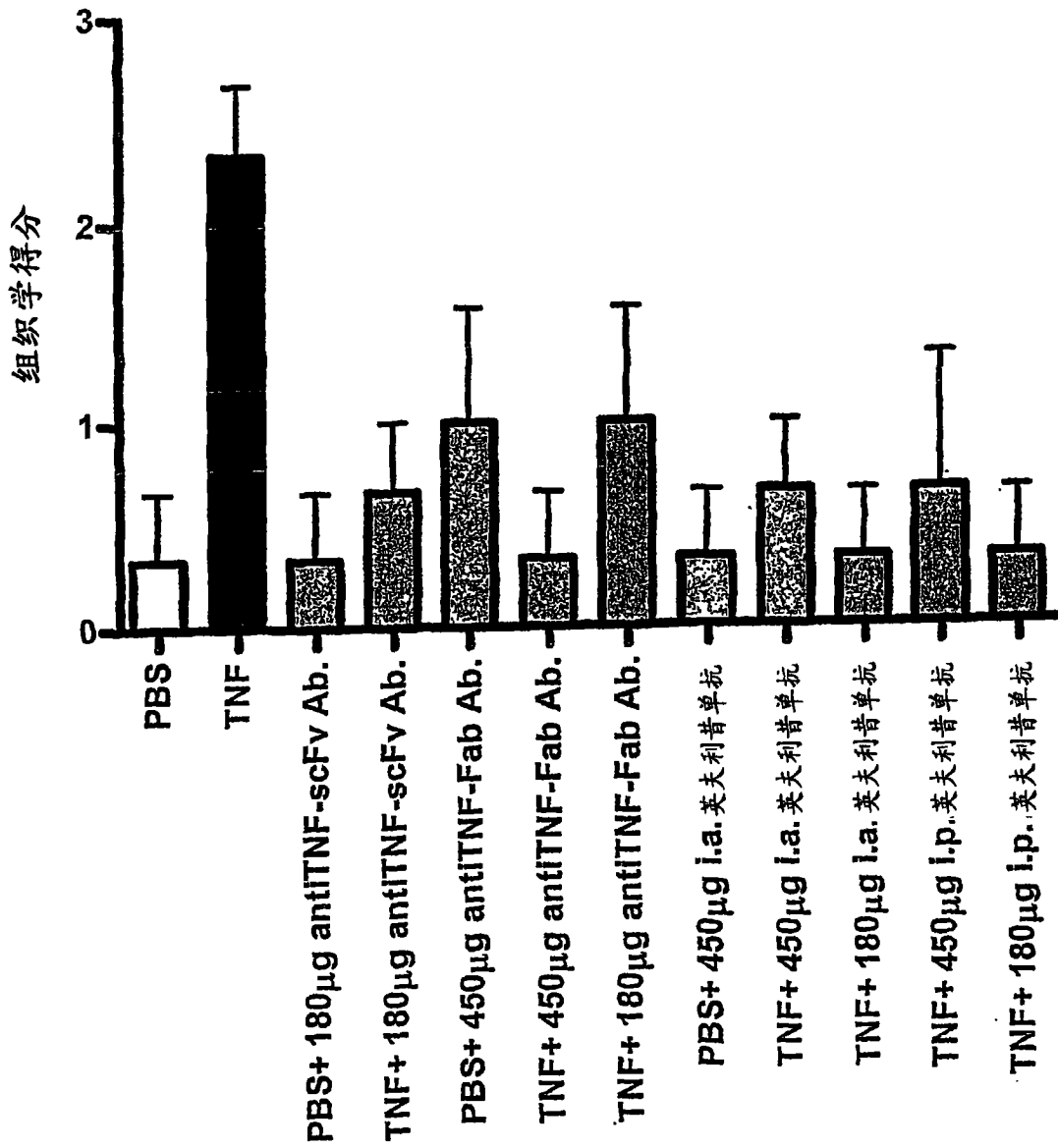


图 8

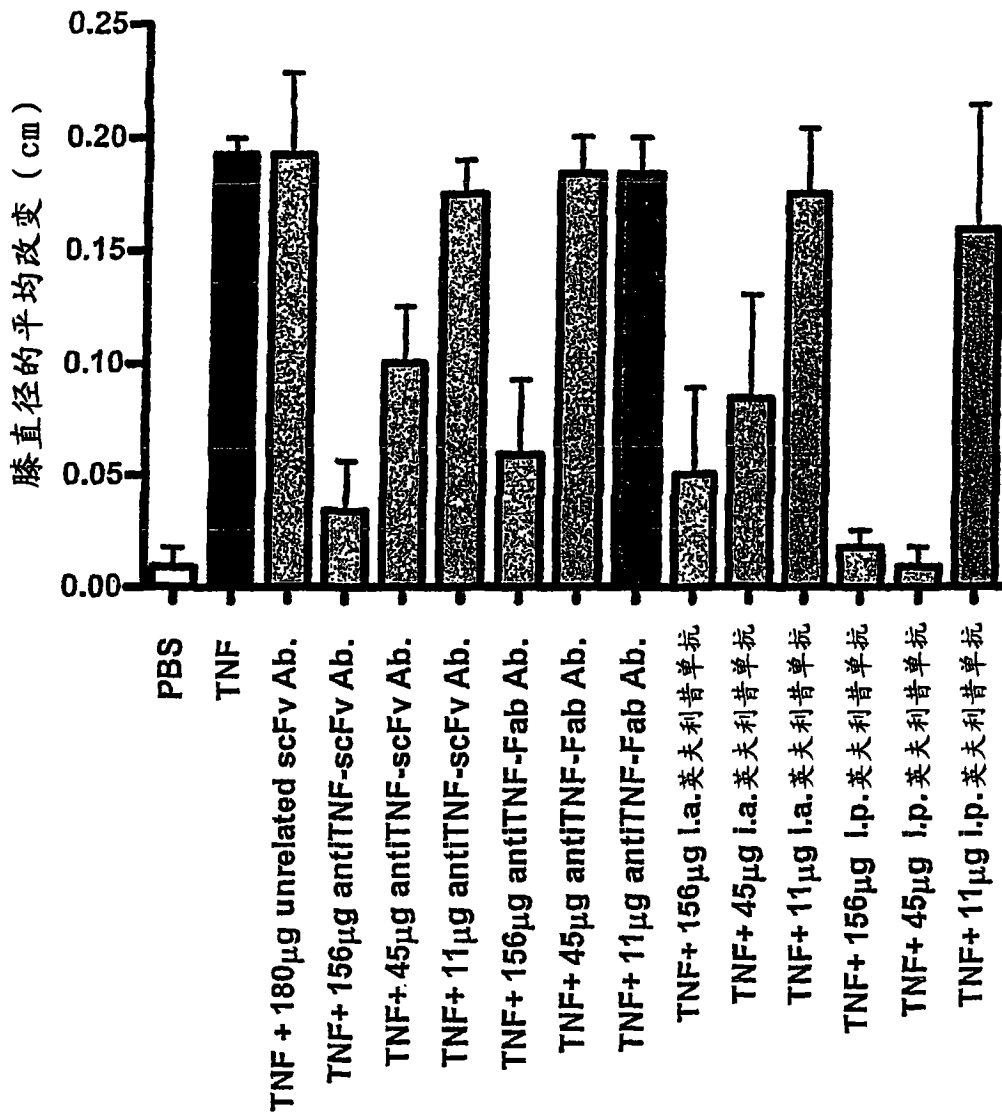


图9

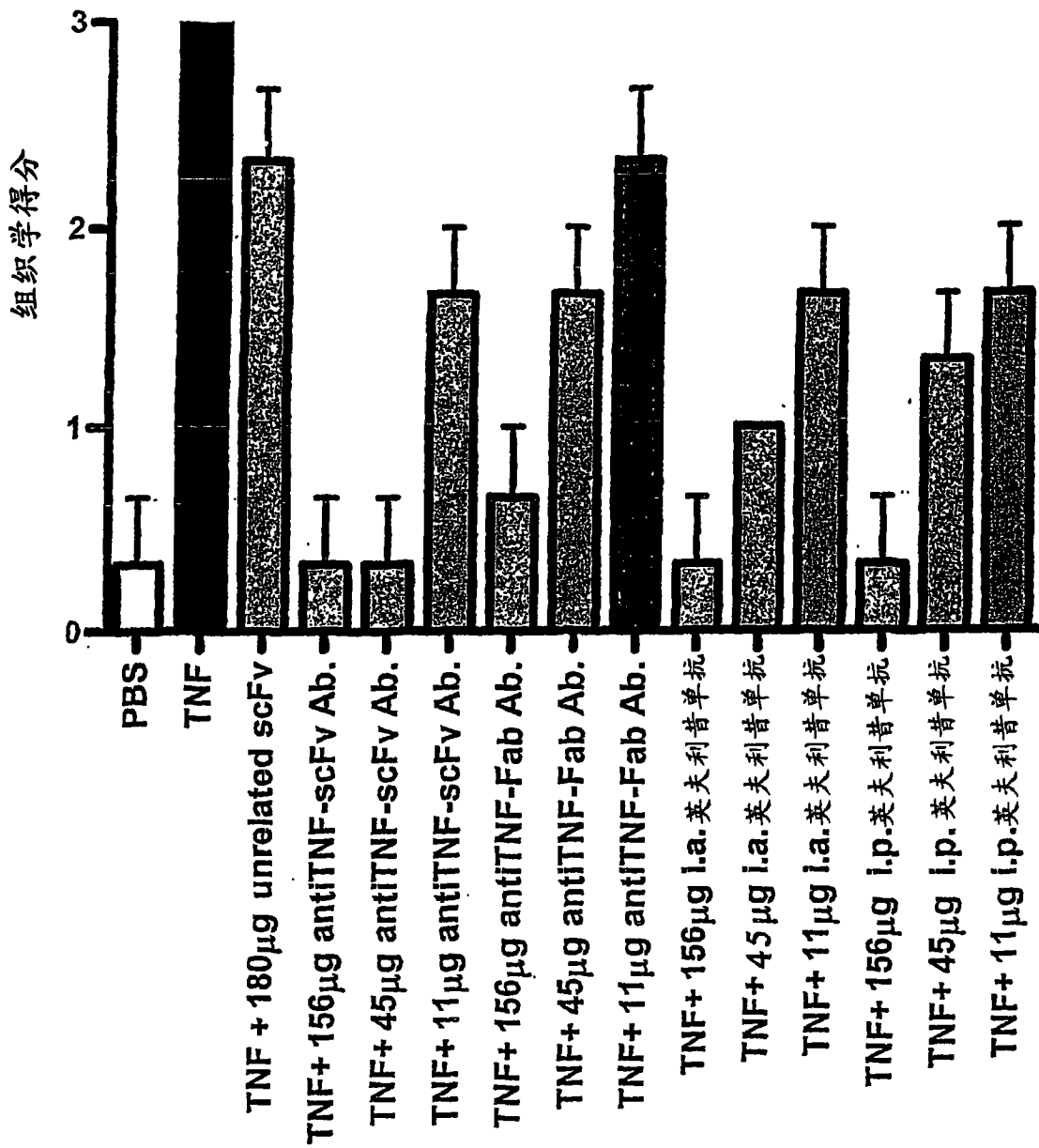
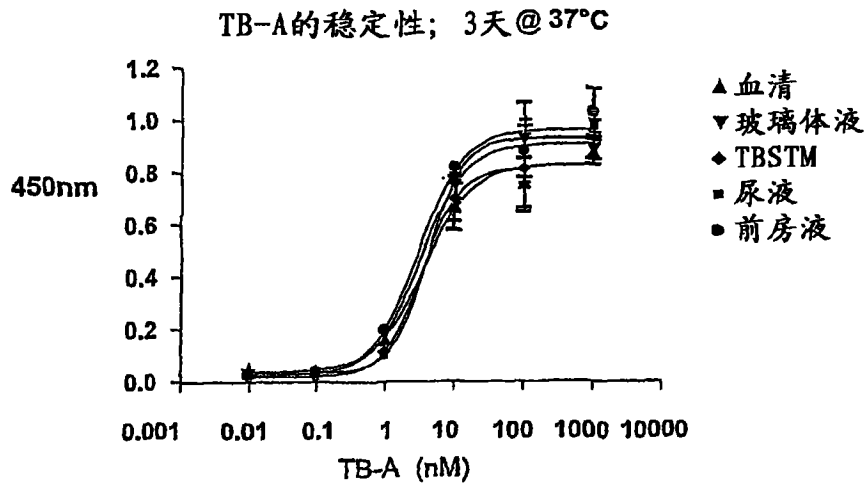


图10



	血清	玻璃体液	TBSTM	尿液	前房液
$K_d$	3.622	3.184	3.394	4.141	2.970

图11

专利名称(译)	抑制TNF $\alpha$ 的稳定和可溶的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101233154B</a>	公开(公告)日	2015-09-09
申请号	CN200680028415.3	申请日	2006-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	艾斯巴技术股份公司		
申请(专利权)人(译)	艾斯巴技术股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾斯巴技术-诺华有限责任公司		
[标]发明人	S埃韦特 A巴尔贝里斯 DM乌雷奇 A奥夫德莫尔 P利希特莱		
发明人	S·埃韦特 A·巴尔贝里斯 D·M·乌雷奇 A·奥夫德莫尔 P·利希特莱		
IPC分类号	C07K16/24 A61K39/395 G01N33/53 C12N15/13 A61P37/00 A61P29/00		
审查员(译)	陈中伟		
优先权	60/785353 2006-03-23 US 60/687971 2005-06-07 US		
其他公开文献	CN101233154A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明特别地涉及对TNF $\alpha$ 特异性的稳定和可溶的scFv抗体和Fab片段，其包含特异性轻链和重链序列，这些序列针对稳定性、可溶性、体外和体内与TNF $\alpha$ 的结合性以及低免疫原性被优化。所述抗体被设计用于诊断和/或治疗与TNF  $\alpha$ 相关的紊乱。还公开了表达本发明重组抗体的核酸、载体和宿主细胞，分离它们的方法和所述抗体在药物中的应用。

ScFv 抗体

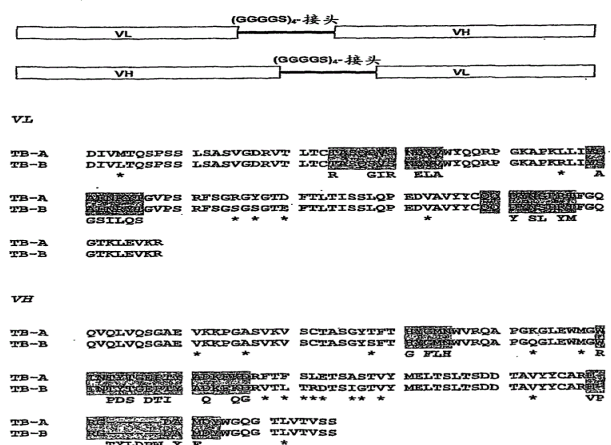


图 1